

LE BOTANISTE

DIRECTEUR M. P.-A. DANGEARD

MEMBRE DE L'INSTITUT

PROFESSEUR DE BOTANIQUE A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

SÉRIE XV

Juin 1923

SOMMAIRE

PRIX DE L'ABONNEMENT A LA SERIE DE SIX FASCICULES
30 francs.

DIRECTION :
1, rue Victor Cousin, Sorbonne, PARIS.

LE BOTANISTE

TABLE DES MATIÈRES

DE LA SÉRIE XV DU BOTANISTE

DEUXIÈME PARTIE

Recherches sur l'aleurone dans les graines et dans les plantules

TROISIÈME PARTIE

Recherches sur le pollen.

QUATRIÈME PARTIE

Questions relatives aux colorants vitaux.

Introduction à la Série XV du Botaniste.

Je suis heureux de présenter aujourd'hui dans cette XV[e] série du *Botaniste* un mémoire de mon fils aîné, dont les travaux ultérieurs porteront comme celui-ci la signature *Pierre Dangeard*, alors que les miens ont toujours été présentés sous la signature *P. A. Dangeard* : de la sorte, aucune confusion ne pourra se produire dans l'esprit des lecteurs.

Les abonnés du Botaniste ne devront pas être étonnés du fait que la XV[e] Série se trouve publiée alors que la Série XIV n'est pas encore terminée : il y a là, je le reconnais, une anomalie regrettable : celle-ci est due à plusieurs causes dont la principale consiste dans le prix élevé de l'impression et des planches : cependant, j'ai bon espoir de pouvoir donner la fin du mémoire sur l'assimilation chlorophyllienne prochainement.

En ce qui concerne les Séries suivantes, mon intention est de les faire paraître régulièrement.

Ma nomination récente à la Chaire de Botanique de la Sorbonne à la place de l'éminent et regretté professeur Gaston Bonnier m'impose des obligations nou-

velles qui peuvent avoir leur répercussion sur le rôle du *Botaniste* et son mode de publication.

Jusqu'ici, depuis l'époque déjà lointaine, où avec la belle audace de la jeunesse, je publiais la I[re] série, j'ai toujours tenu à conserver à ce journal un caractère très personnel : en assumant désormais la direction d'un Laboratoire de recherches, je puis être amené à augmenter le nombre des collaborateurs et par suite à élargir le champ des observations dans tous les domaines de la Botanique générale.

Recherche sur l'appareil vacuolaire dans les végétaux

INTRODUCTION

La connaissance de la cellule a fait récemment d'importants progrès. Ceux-ci sont dus non seulement au nombre et à la valeur des chercheurs qui ont abordé ces difficiles problèmes dans tous les pays, mais aussi à la perfection des techniques employées et à l'introduction de nouvelles méthodes d'investigation.

Tous les êtres vivants étant formés de cellules, on conçoit que l'étude de celles ci soit d'un intérêt capital pour une meilleure compréhension de la vie. C'est ce qui explique l'importance que prend de plus en plus la Science de la cellule ou Cytologie parmi les travaux modernes.

Ces recherches n'ont pas uniquement un intérêt théorique ou philosophique, car leur portée est grande dans le domaine médical où la connaissance des altérations cellulaires peut éclairer un diagnostic. Cependant n'auraient-elles aucune répercussion pratique que ces études n'en seraient pas moins passionnantes, car c'est à leur sujet que se posent les grands problèmes biologiques dont la solution préoccupera toujours les esprits : celui de la constitution intime de la matière vivante, celui de la sexualité ou de l'hérédité. Enfin si l'on veut établir une comparaison entre les Végétaux et les Animaux c'est la Cytologie qui permet de rechercher les points communs ou d'évaluer les différences, puisque l'existence des phénomènes cellulaires chez les uns et chez les autres constitue le principal trait commun aux deux règnes.

Nous avions pensé au début de ces recherches pouvoir entreprendre des investigations parallèles chez les animaux et chez les végétaux. Il est certain qu'un travail de Cytologie gagnerait à être poursuivi dans ces conditions ; nous avons été bientôt forcé, par suite de l'étendue du sujet, de nous cantonner dans les limites de la Botanique.

Les données déjà anciennes que nous possédons sur la structure de la cellule, remontent aux fondateurs de la théorie cellulaire, à Dujardin, Schleiden, Schwann. Après les travaux des dernières années qui ont complété et précisé un grand nombre de détails, on peut résumer ainsi nos connaissances.

La cellule végétale se compose essentiellement d'une petite masse de matière albuminoïde, le cytoplasme, souvent entourée et protégée par une membrane cellulosique et qui contient toujours à son intérieur un noyau. Le cytoplasme se présente comme une masse amorphe, hyaline, peu refringente et qui paraît être de consistance plus ou moins visqueuse. Lorsqu'on l'observe à un très fort grossissement, il donne l'impression soit d'une substance homogène, soit d'une substance très finement granuleuse.

Le noyau est généralement arrondi et bien délimité par une fine membrane. Il contient un ou plusieurs nucléoles. Au moment de la division cellulaire, sa substance se découpe en tronçons, les chromosomes, qui se répartissent d'une façon égale entre les noyaux fils. La présence constante du noyau dans toute cellule et les phénomènes très curieux de la division nucléaire ont fait donner au noyau une importance exceptionnelle dans la cellule.

Nous n'avons cependant aucune raison de ne pas attribuer au cytoplasme un rôle égal à celui du noyau dans les manifestations de la vie.

C'est pourquoi son étude a été poursuivie activement depuis quelque temps. Nous laisserons pour notre part la question du noyau cellulaire complètement de côté, pour nous consacrer uniquement aux problèmes que pose le cytoplasme.

Cette gelée primitive, base de la vie, que l'on nomme encore protoplasme, nous est très mal connue, mais elle renferme à son intérieur des corps variés qui sont beaucoup mieux définis ; certains d'entre eux sont certainement de la matière vivante, mais néanmoins ils se distinguent toujours du cytoplasme parce qu'ils en sont séparés par un contour précis.

Ces éléments sont les *plastes* ou *leucites* qui peuvent être colorés en vert par la chrorophylle, les *microsomes*, les gouttelettes d'huile, les *grains d'aleurone* qui sont des substances de réserve, les vacuoles qui sont des réservoirs de suc cellulaire. Ces formations n'ont pas une importance égale partout et elles ne sont pas de même valeur. C'est ainsi qu'une cellule de la feuille d'une mousse renferme une grande quantité de plastes verts tandis qu'une cellule de champignon en est dépourvue. Une cellule de l'albumen du Ricin renferme de l'aleurone et de l'huile en abondance ; ce sont les plastes porteurs d'amidon qui dominent dans une cellule du tubercule de la pomme de terre. Les vacuoles enfin sont prépondérantes dans le tissu aqueux de la pulpe d'orange. Les variations sont donc très grandes d'un tissu à l'autre et d'un végétal à un autre. Ces modifications, jointes à celles qui portent sur la membrane et sur le noyau, suffisent à donner à chaque tissu, à chaque partie d'un végétal sa physionomie propre.

Il en résulte que pour avoir une idée assez exacte de la nature des éléments que contient le cytoplasme, il faudrait suivre leur évolution à partir de l'œuf et durant tout le développement du végétal, voir quelles sont les transformations qu'ils subissent, suivant qu'ils font partie de tel ou tel tissu différencié et cela pendant le cycle entier de la vie d'une plante.

Cette façon d'envisager les questions cellulaires caractérise les travaux modernes : on ne se contente pas d'étudier la cellule dans un tissu donné, mais on suit l'évolution de ses diverses parties au cours du développement ; on conçoit que cette étude soit parfois très difficile, mais elle apporte des

renseignements très précis sur la valeur des organites constitutifs du cytoplasme.

On a été ainsi conduit tout naturellement à distinguer parmi les éléments du cytoplasme des corps constants et des corps dont la présence n'est que temporaire. Les premiers ont certainement une grande importance puisque toute cellule les possède ; les seconds dont l'existence n'est que transitoire, n'ont aussi qu'un moindre rôle.

Les efforts des cytologistes qui ont étudié la cellule végétale dans ces dernières années ont eu pour résultat de montrer la constance d'un certain nombre d'organes cellulaires considérés autrefois comme accessoires.

Depuis les travaux de Schimper, les plastes ou plastides végétaux sont considérés comme des éléments constants de la cellule végétale au même titre que le noyau. Bien que les conclusions de cet auteur aient été adoptées en général par les botanistes. elles demandaient encore de nouvelles démonstrations. M. P. A. Dangeard a fourni récemment un argument de grande valeur en faveur de cette autonomie de l'appareil plastidaire par ses études sur la Sélaginelle. Il a montré que dans les cellules jeunes du méristème de cette cryptogame vasculaire, il n'y avait qu'un seul plaste dont proviennent par division tous les chloroplastes qui sont nombreux dans les cellules adultes en fonctionnement chlorophyllien.

Une semblable indépendance du système des plastes a été démontrée par les travaux concordants de Sapehin, Scherrer et Mottier chez les Muscinées. On sait qu'elle existe chez les Algues où l'on a remarqué depuis longtemps que les plastes colorés par le pigment assimilateur persistent pendant toute la durée du développement et se conservent même dans les gamètes reproducteurs. Chez les Phanérogames, la question était plus difficile à élucider, parce que les plastes s'y présentent sous des aspects variés (leucoplastes, amyloplastes, mitoplastes, chloroplastes), néanmoins tous les travaux importants sur ce sujet, en particulier ceux de M. Dangeard et de M. Guillermond,

apportent une confirmation à la thèse de Schimper sur la permanence des plastes. Il paraît donc bien établi actuellement que les plastes ou plastides végétaux constituent un ensemble d'éléments constants, au même titre que le noyau, se multipliant par division les uns à partir des autres ; c'est à cet ensemble que M. P. A. Dangeard a donné le nom de *plastidome*.

En dehors des plastes, on a mis en évidence dans la cellule de très petits éléments arrondis ou en courts bâtonnets dont la fonction est encore complètement inconnue : ce sont les *microsomes*. Ces éléments se fixent et se colorent en général comme les plastes, aussi la confusion est-elle facile avec ces derniers. La tendance actuelle des cytologistes est de les considérer comme formant un ensemble spécial n'ayant aucune relation avec les plastes ; c'est l'opinion des savants dont nous avons déjà cité les noms. Ces microsomes forment un ensemble auquel M. P. A. Dangeard a donné le nom de *sphérome* (1). Beaucoup d'auteurs leur appliquent le terme de *chondriosomes* (MM. Sherrer, Sapehin, Mottier) ou celui de *mitochondries inactives* (M. Guilliermond). Leur mode de multiplication est entouré d'obscurité ; ils semblent qu'ils soient capables de se diviser comme les plastes et de se propager ainsi de cellules à cellules. Ce qui paraît certain, c'est leur présence constante dans toutes les cellules, dans tous les groupes végétaux.

Leur rôle est absolument inconnu jusqu'à présent. Ils doivent être soigneusement distingués des petites gouttelettes d'huile qui ne sont que des éléments transitoires On les reconnaît toujours par leur propriété de se colorer par l'hématoxyline en noir comme les plastes.

A côté du plastidome et du sphérome, la cellule végétale contient fréquemment de petites cavités ou chambres remplies d'un liquide clair dénommé le suc cellulaire. Ces éléments ont reçu le nom de *vacuoles* et leur ensemble forme l'appareil ou le système vacuolaire de la cellule. Ce système

(1) Avec cette dénomination, les microsomes deviennent des *sphérosomes*.

est très peu apparent dans certaines cellules, en particulier dans les cellules jeunes des méristèmes, de sorte que l'on a nié son existence dans ces organes jusque dans ces dernières années (1). Il en résultait que l'on décrivait et que l'on décrit encore dans les traités classiques, la naissance et l'évolution des vacuoles à partir des cellules embryonnaires, de la manière suivante : au début, les cellules de méristème ont un cytoplasme plein, dépourvu de vacuoles ; dans les cellules un peu éloignées du point végétatif, de petites vacuoles apparaissent ; elles grossissent dans les cellules plus âgées et se fusionnent finalement en une seule grosse vacuole, qui refoule cytoplasme et noyau à la périphérie. Comment se forment les premières vacuoles ? Cette apparition de vacuoles dans un cytoplasme primitivement compact, paraissait si naturelle ou même si dénuée d'intérêt que, en général, personne ne se posait la question. On supposait que les vacuoles naissaient parce que la cellule se saturait d'eau et que l'eau se séparait à un moment donné des molécules constituantes du cytoplasme et s'isolait, comme s'isolent les bulles dans une mousse de savon.

Par conséquent, il était logique de penser, que lorsque les petites vacuoles se formaient, elles étaient très aqueuses, et personne ne songeait que les vacuoles pouvaient présenter un état demi-fluide à leur début et ne s'hydrater que peu à peu.

Il y eu tout de même quelques botanistes dont les idées marquèrent une plus exacte appréciation du rôle et de la signification de l'appareil vacuolaire. Ce furent les biologistes de l'école de de Vries. Ils voyaient juste, lorsqu'ils considéraient les vacuoles comme des éléments constants de la cellule, mais leur appréciation ne reposait pas sur des faits bien probants ; en outre ils soutenaient en même temps des idées

(1) Un élève de de Vries, Went, avait cependant écrit en 1888 que toutes cellules renferment des vacuoles, même celles des méristèmes, mais il ne fut guère suivi dans ces conclusions. On trouvera plus loin un exposé de ses travaux.

difficiles à admettre sur la membrane différenciée des vacuoles ou *tonoplaste*, ce qui contribua à discréditer l'ensemble de leurs conceptions.

Dans ces dernières années, l'emploi systématique d'une méthode spéciale celle des *colorations vitales*, amena M. P. A. Dangeard à une interprétation différente de l'appareil vacuolaire.

Nous devons dire en quelques mots quelle est cette méthode dont l'utilisation généralisée a véritablement bouleversé nos anciennes notions. Elle consiste à soumettre des fragments de végétaux vivants, de jeunes feuilles par exemple, à l'action d'un colorant très dilué ; seules certaines matières colorantes réussissent dans ces conditions à pénétrer dans la cellule vivante, on les désigne du nom de « *colorants vitaux* ». Le meilleur d'entre eux est incontestablement le rouge neutre avec lequel les insuccès sont tout à fait rares ; le bleu de crésyl brillant est d'un emploi presque aussi commode, puis viennent le bleu de Nil, le bleu de méthylène, le vert Janus et la liste pourrait être encore allongée. Le colorant vital, après avoir franchi la membrane, se fixe sur les vacuoles, dont le suc prend une teinte très vive, alors que le reste de la cellule, protoplasme et noyau demeure incolore.

On possède alors une image extrêmement nette et précise de l'appareil vacuolaire dont les moindres détails se détachent vigoureusement sur un fond incolore.

Ce qui fait la grande valeur de cette méthode pour l'étude des vacuoles, c'est que la coloration est spécifique, c'est à dire qu'elle s'applique toujours aux mêmes éléments, à tel point qu'une teinture vitale au rouge neutre permettra toujours de distinguer l'appareil vacuolaire des autres formations présentes dans la cellule. Il n'a été jusqu'ici constaté qu'un très petit nombre d'exceptions à cette règle, aussi bien chez les Algues et les Champignons variés que chez les Cryptogames vasculaires et les Phanérogames (1).

(1) Consulter le chapitre consacré aux colorants vitaux où ces exceptions sont examinées.

Cette généralité des phénomènes de coloration vitale a été mise en lumière par M. P. A. Dangeard et nous l'avons confirmée dans les exemples que nous avons étudiés personnellement. Sans doute, les procédés eux-mêmes ne sont pas nouveaux, ils ont maintes fois été utilisés par les zoologistes, et même quelques botanistes en ont fait un usage assez important (Pfeffer), mais l'on considérait cette méthode comme ayant une action très incertaine et très variable qui ne pouvait nullement servir à définir un ensemble autonome d'éléments cellulaires (2).

Il est désormais démontré que chez les végétaux, l'emploi des colorations vitales permet de délimiter et de distinguer l'appareil vacuolaire de toutes les autres formations. Cette proposition jusqu'à présent demeure dans le domaine de l'hypothèse en ce qui concerne la cellule animale.

Grâce à ce phénomène encore mal expliqué des colorations vitales, beaucoup de faits nouveaux ont été décrits par M. P. A. Dangeard. Il a remarqué d'abord que les cellules les plus jeunes des méristèmes, n'étaient pas dépourvues de vacuoles, comme beaucoup de botanistes le pensaient, mais qu'elles renfermaient des corpuscules de substance vacuolaire très condensée, qui lorsqu'ils s'hydratent, sont le point de départ des vacuoles typiques. Nous avons montré pour notre part, qu'une disposition homologue se rencontrait dans les graines, et que les corpuscules de substance vacuolaire concrétée, étaient représentés précisément par les grains d'aleurone connus depuis plus d'un demi siècle, mais dont la véritable nature et la signification étaient encore douteuses. Ainsi un parallélisme frappant existe entre les divers tissus d'un végétal qui passent par une période de vie ralentie, tout s'enchaîne harmonieusement, et le système vacuolaire devient avec les idées nouvelles un appareil autonome, du point de vue morphologique comme du point de vue génétique, présent dans toutes les cellules.

(2) Cette opinion se trouve signalée dans un article de M. P de Beauchamps sur les colorations vitales paru dans l'année biologique.

Le fait qu'aucune cellule végétale n'est dépourvue d'appareil vacuolaire, pose un problème très important, celui de la permanence des vacuoles en tant qu'éléments de la cellule. On a vu précédemment, toute l'importance que l'on attribue aux éléments cellulaires constants, comme le noyau et les plastes. Si les vacuoles sont présentes partout, à tous les stades de la vie d'une plante, leur importance se trouve rehaussée d'une façon considérable et il n'y a aucune raison pour ne pas faire jouer à leur substance propre un rôle dans l'hérédité. C'est bien ce que l'on constate et la cause en est, que la substance vacuolaire ne se perd pas, mais se transmet d'une cellule à une autre pendant la division. On peut donc dire que toute vacuole provient d'une vacuole préexistante, de même que tout noyau provient d'un autre noyau.

Les colorations vitales ont révélé des aspects très variés et assez inattendus, présentés par l'appareil vacuolaire dans les cellules de méristème : ce sont des formes filamenteuses ou délicatement reticulées dont la disposition varie avec les mouvements du cytoplasme.

Ces états très curieux ne sont pas conservés d'ordinaire par les fixateurs et l'on conçoit que l'on ait pu commettre l'erreur de croire les cellules jeunes dépourvues d'appareil vacuolaire. Les vacuoles sont peut-être encore plus curieuses par leur nature chimique que par leur extrême plasticité. La plus grande diversité règne, comme on le sait, en ce qui concerne les substances contenues dans leur intérieur, albuminoïdes, alcaloïdes, glucosides, tannins, pigments anthocyaniques, acides divers, diastases, etc... Elles sont le laboratoire où se déversent tous les produits de l'activité cellulaire.

Cependant, malgré cette variété, il y a toujours phénomène de coloration vitale ; dans tous les cas, la vacuole accumule le colorant vital à son intérieur et prend ainsi une teinte très vive. A quoi est due cette attirance ? Evidemment à un corps ou à un groupe de corps contenus dans le vacuome. M. P. A. Dangeard a donné un nom à cette substance ; il l'a nommée

métachromatine et dans son hypothèse toute vacuole végétale sans exception renferme de la métachromatine qui lui donne ses principales propriétés. Cette substance n'est d'ailleurs pas entièrement hypothétique, car la métachromatine était déjà connue chez les Algues et les Champignons et c'est aussi M. Dangeard qui avait montré dans ses travaux précédents que la métachromatine est toujours présente dans l'appareil vacuolaire.

En allant plus loin, il a généralisé cette notion en l'étendant à toutes les vacuoles végétales. En le faisant, il s'est attiré des critiques inconsidérées ; en effet si l'on est loin d'avoir prouvé l'existence de la métachromatine dans toutes les vacuoles, il ne s'ensuit pas qu'elle n'y existe pas néanmoins et l'hypothèse de M. P. A. Dangeard sur la métachromatine est assez séduisante pour être adoptée par tous les esprits généralisateurs.

Cette question, en même temps que d'autres qui peuvent se poser à propos des vacuoles végétales, sera abordée et discutée au cours de l'exposé.

Une première partie sera consacrée à la description des organes en voie de croissance des Gymnopermes (bourgeons foliaires) ; pendant le développement de ceux-ci, il se produit une évolution des vacuoles qui était restée jusqu'ici inconnue.

Dans une deuxième partie, les transformations de l'aleurone, cette matière protéique si importante des graines, seront décrites pendant la maturation et pendant la germination, chez les Gymnospermes, le Ricin et les Graminées. C'est une autre face des phénomènes d'évolution vacuolaire, pour laquelle une attention spéciale a été réservée dans ce travail.

Un complément s'imposait à ces recherches ; il consistait à montrer l'importance du système des vacuoles dans les organes reproducteurs eux-mêmes. Cette partie sera plus courte que les précédentes : elle comprend une étude des vacuoles dans le pollen chez divers Gymnospermes.

Plusieurs problèmes très différents se rapportent aux vacuoles végétales. Une préoccupation première a été bien entendu de

faire connaître aussi exactement que possible des observations de morphologie cellulaire qui sont nouvelles. La précision en ces matières est la principale garantie des conclusions que l'on formule. Mais l'attention d'un naturaliste, même s'il s'occupe de cytologie, ne saurait se cantonner dans des détails morphologiques ; elle doit s'élever à la recherche des causes et pour les découvrir avoir recours à l'expérimentation.

A ce genre d'études se rapportent des recherches groupées dans une quatrième partie de cette thèse. La *métachromasie* des vacuoles a été comparée à des phénomènes de virage des colorants observés « in vitro ». A côté de ce chapitre un autre traitera du mode d'action des colorants divers « réputés vitaux » (colorants vacuolaires et non vacuolaires) et l'on verra ainsi que d'autres éléments cellulaires en dehors des vacuoles peuvent être reconnus par la méthode des teintures vitales.

La méthode des colorants vitaux, a été notre principale technique dans ce travail ; les résultats qu'elle donne sont très sûrs ; nous le montrerons en décrivant les faits et en établissant la comparaison avec d'autres procédés. Cette comparaison est nécessaire, car il n'existe pas en cytologie de méthodes parfaites ; il faut donc pouvoir discuter de leur valeur et ne pas s'en rapporter au témoignage d'une seule.

La chimie végétale ne peut non plus laisser indifférent un cytologiste. Il est intéressant de soumettre à l'analyse une plante entière ou quelques-uns de ses organes, mais il n'est pas négligeable de pouvoir déceler les substances, au moment de leur apparition dans la cellule elle-même. C'est pourquoi il serait excellent que le cytologiste fût en même temps un chimiste. Dans cet ordre de recherches, on peut citer les travaux de MM. Guignard et ceux d'Errera, les uns sur les principes actifs des Crucifères, les autres sur le glycogène des végétaux.

La science de la michrochimie est bien peu avancée, cependant l'on sait très bien reconnaître dans une cellule des corps comme l'amidon, le glycogène, l'inuline, les tannins, etc...

on peut noter le lieu d'apparition de certains d'entre eux. Il y a un fait remarquable pour plusieurs de ces substances, c'est que leur formation a lieu dans une partie bien définie de la cellule. Ainsi l'amidon se forme toujours à l'intérieur des plastes, les tannins, l'anthocyane dans les vacuoles et il serait aussi surprenant de voir les plastes sécréter des vésicules de tannin ou des gouttes d'anthocyane que de constater l'apparition de véritable amidon dans une vacuole. Or la connaissance de quelques-uns de ces faits est le fruit de travaux tout récents.

On trouvera ici une contribution à l'évolution chimique des vacuoles et au mode d'apparition cytologique de deux groupes de substances vacuolaires très répandus, les tannins et les anthocyanes. L'exposé ne constitue pas un chapitre spécial, mais se trouve incorporé dans les recherches de pure morphologie.

La même remarque peut être faite pour la partie cytologique où sont exposés les faits obtenus après fixation et coloration. Leur description a été annexée à chacun des chapitres afin qu'on puisse confronter facilement les résultats obtenus.

Enfin nous indiquerons en terminant les conclusions générales que l'on peut formuler sur tous ces sujets. Dans l'ensemble, notre programme a été de montrer que l'on peut par la combinaison de moyens divers, même simples, et par l'observation des éléments vivants à diverses époques de leur évolution, élargir notre connaissance de la vie cellulaire.

HISTORIQUE

Les premiers botanistes qui eurent une connaissance précise de la cellule végétale, ne manquèrent pas d'être frappés par la présence très fréquente au sein du protoplasme de lacunes plus ou moins volumineuses remplies d'un liquide clair, le suc cellulaire. Ils nomment ces espaces des vacuoles et constatent que le liquide qu'elles renferment, est formé pour la plus grande part d'eau, tenant en dissolution diverses substances salines en petites quantités.

Il existe d'après eux des cellules sans vacuoles : ce sont les cellules jeunes, que l'on observe dans les méristèmes, où elles se multiplient activement en vue de la croissance des organes. A mesure que ces éléments vieillissent, il apparaît dans leur protoplasme des vacuoles d'abord petites, qui grossissent peu à peu et finissent généralement par confluer en une énorme et unique vacuole remplissant presque toute la cavité cellulaire et qui rejette noyau et protoplasme à la périphérie.

Ces vacuoles peuvent naître à l'intérieur du protoplasme à une place quelconque : elles résultent de l'agrandissement d'espaces d'abord minimes et microscopiques dans lesquels se rassemble le trop-plein de l'eau retenue par le protoplasme.

Les vacuoles n'ont pas, par conséquent, un caractère permanent : elles sont absentes dans les cellules jeunes embryonnaires et leur apparition, ainsi que leur croissance, se produit au cours de l'évolution que subissent les cellules jeunes avant d'atteindre l'état adulte.

Leur mode de naissance est un phénomène qui reçoit une facile explication : à un moment donné, le protoplasme saturé d'eau en laisse filtrer une certaine quantité entre ses mailles et les petits intervalles ainsi créés n'ont plus qu'à grossir, pour prendre la forme et l'apparence de vacuoles normales.

On ne doit accorder aucun caractère de vie à ces espaces, qui ne peuvent être envisagés que comme des éléments morts, en opposition complète avec le plasma vivant doué de toutes les fonctions et de toutes les propriétés de la vie.

Ces idées sur les vacuoles végétales, exprimées dans les travaux de botanistes tels que Naegeli, Von Mohl, Hanstein, sont encore en faveur à l'heure actuelle : il est donc intéressant de connaître leur origine. Elles n'accordent pas aux vacuoles une importance morphologique en rapport avec les fonctions vitales qu'elles jouent en réalité. En effet, l'on sait depuis longtemps que le suc vacuolaire, grâce aux sels dissous qu'il contient détermine un appel d'eau à l'intérieur des vacuoles, ce qui entraîne une pression de turgescence et une certaine rigidité des tissus de la plante. Un premier rôle des vacuoles est donc d'assurer la fermeté des organes.

L'arrivée de l'eau et des sels dissous du milieu extérieur, provoque, d'autre part, suivant les lois physiques de l'osmose applicables au suc des vacuoles, l'entrée des aliments minéraux nécessaires à la vie des cellules et à celle de la plante tout entière. Les vacuoles ont donc un rôle de premier plan dans le mécanisme de la nutrition et des échanges qui ont lieu de cellule à cellule.

Le désaccord paraît marqué entre la faible valeur morphologique des vacuoles, comme constituant cellulaire, et leur rôle physiologique si important. C'est probablement pour cette raison qu'un botaniste hollandais, De Vries, fut conduit à exprimer une opinion différente au sujet des vacuoles.

Ce dernier, en effet, est l'auteur d'une théorie nouvelle sur la nature véritable des vacuoles. Celles-ci, pour les botanistes précédents n'ont qu'un caractère d'éléments accidentels ; elles

deviennent au contraire pour le savant hollandais des parties constitutives de la cellule, permanentes et comparables sous ce rapport aux noyaux et aux chromatophores.

De Vries commence par montrer qu'il y a des vacuoles dans les cellules les plus jeunes : il les met en évidence dans les racines de germinations de *Zea Mays* au moyen de la plasmolyse. Par conséquent les cellules des méristèmes ne sont pas dépourvues de vacuoles comme on le croyait. En ce qui concerne leur origine, il ne peut donner de conclusion certaine, mais il ne croit pas que les vacuoles puissent se former directement dans le plasma, c'est-à-dire naître « de novo ». Il incline à penser qu'il apparaît d'abord un corps solide dans lequel se forme le suc cellulaire, de la même façon que l'amidon se forme dans un plaste.

Dans le cas des cellules adultes et aussi des cellules d'algues (*Spirogyra*), il montre que la paroi des vacuoles peut rester vivante après la mort du cytoplasme. Dans ses expériences, l'auteur emploie souvent une solution de nitrate de potasse à 10 o/o colorée par de l'éosine : les cellules sont plongées dans ce milieu, il se fait un plasmolyse, puis le protoplasme et le noyau meurent et se teignent en rose, tandis que la vacuole reste incolore un certain temps. De ces faits, il tire la conclusion que la vacuole possède une paroi vivante à laquelle il donne le nom de *tonoplaste*.

Aucune plante ne lui paraît plus démonstrative pour affirmer l'existence de ce tonoplaste que les *Spirogyra*.

Ainsi, pour de Vries, la membrane vacuolaire est une paroi vivante, qui sécrète le suc cellulaire comme le plaste sécrète l'amidon. Le tonoplaste a encore pour rôle de maintenir le suc cellulaire à une concentration convenable pour le fonctionnement physiologique. Les tonoplastes ne se forment jamais « de novo » mais tout tonoplaste provient nécessairement d'un tonoplaste préexistant, de la même façon que tout noyau provient d'un autre noyau (de Vries 1885).

Parmi les recherches inspirées par la théorie de de Vries,

nous devons mentionner celles de Went (1888) et de Tswett (1896). Le premier auteur est un élève de de Vries et il développe dans son travail et cherche à prouver les idées théoriques suivantes.

1° Toutes les cellules vivantes contiennent des vacuoles. Pour les observer dans les cellules de méristèmes, il pratique des coupes longitudinales qu'il place dans une solution de glucose à 3 ou 5 o/o suivant une technique indiquée par Strasbürger. Dans ces conditions il met en évidence partout de petites vacuoles. *Cependant il arrive que le cytoplasme soit trop épais pour que l'on puisse discerner les vacuoles.*

Les exemples étudiés sont nombreux : racines d'*Allium Cepa*, *Vicia Faba*, *Lupinus luteus*, *Zea Mays*, etc... sommets de tiges d'*Asparagus*, *Aristolochia*, *Hippuris vulgaris*, etc... ; cellules terminales de Cryptogames, *Salvinia natans*, *Cyathea* ; Champignons, où il note que, *dans quelques cas, les filaments jeunes ont un contenu épais où les vacuoles sont invisibles.*

2° Les vacuoles se multiplient les unes à partir des autres par division et elles peuvent aussi se fusionner après coup entre elles, par exemple chez les Champignons, dans les grains de pollen, les méristèmes, dans les tentacules de *Drosera* où le phénomène avait été vu par de Vries.

3° Les vacuoles ne se forment jamais aux dépens du protoplasme comme l'ont admis Nageli, Hofmeister et Sachs. Dans tous les cas où l'on a cru voir se former de nouvelles vacuoles, là où il n'y en avait pas auparavant, il s'agissait d'un simple gonflement de vacuoles préexistantes.

Went a donc décrit beaucoup de faits intéressants sur les vacuoles, malheureusement, il ne prouve pas la plupart des conclusions théoriques qu'il énonce. La faiblesse de plusieurs de ses arguments fera que ses idées ne seront pas prises en suffisante considération.

Dans un autre mémoire paru en 1889, Went entreprend de démontrer que les vacuoles sont présentes dans les corps reproducteurs des algues. Il a étudié les zoospores de *Codium*

tomentosum, du *Chaetomorpha aerea*, les organes mâles et femelles du *Cystoseira abrotanifolia* et du *Sargassum linifolium*, les pollinides les carpospores et les tetraspores d'un certain nombre de Floridées. Partout, il est arrivé aux mêmes conclusions : les vacuoles des différents corps reproducteurs proviennent par voie de division de la vacuole de leur cellule mère. Ces observations renforcent donc ses convictions sur la nature des vacuoles.

Van Tieghem à la même époque en France, se montre favorable aux idées de de Vries et il les modifie légèrement pour donner sur le système vacuolaire une opinion qui s'apparente de près à celle de l'école hollandaise. Pour lui les vacuoles sont comparables aux leucites et il abandonne le mot de vacuole pour le remplacer par celui *d'hydroleucite*, c'est-à-dire de leucite aquifère (1888).

En Allemagne au contraire les idées de de Vries sont heurtées de front et fortement critiquées par plusieurs botanistes éminents à la tête desquels se trouve Pfeffer.

Dans un mémoire étendu paru en 1890, Pfeffer donne une critique très serrée de la thèse de de Vries. Pour lui les vacuoles sont si peu des formations autonomes que l'on peut les faire naître artificiellement. Un plasmode de Myxomycète (*Chondrioderma*) peut englober des particules d'asparagine. Si, ensuite on replace ce plasmode dans l'eau, il se forme par dissolution du cristal, une vacuole qui persiste et qui montre toutes les propriétés des vacuoles normales.

D'autre part, il nie l'autonomie des membranes vacuolaires ou tonoplastes ; cette membrane n'a pas d'individualité propre, car elle se forme aux dépens du cytoplasme, lorsque celui-ci est mis au contact de l'eau et par suite de ce contact même.

Il constate que, dans un protoplasme dépourvu de vacuoles, on en voit apparaître soudain un grand nombre et il lui paraît bien hypothétique d'admettre qu'elles se sont développées dans ce cas, aux dépens d'ébauches préexistantes, quoique absolument invisibles.

Quant à la multiplication des vacuoles par division indiquée par de Vries, elle n'est pas du tout une preuve qu'il ne peut pas naître de nouvelles vacuoles directement. La division des vacuoles pendant la division de la cellule est une nécessité évidente *à priori* et qui ne prouve rien.

Pfeffer contribue donc à ruiner les idées théoriques émises par de Vries et il maintient les données anciennes de Von Mohl, Hofmeister, Naegeli sur les vacuoles. *Ce sont des productions aqueuses qui naissent dans le cytoplasme à un emplacement quelconque*; les résultats des expériences sur la formation artificielle des vacuoles dans les plasmodes doivent être étendus aux autres cas et l'on doit admettre partout la possibilité d'une *néoformation des vacuoles.*

Tswett en 1896, dans ses recherches de physiologie cellulaire, ne se décide pas nettement en faveur de l'une ou de l'autre théorie. Il reconnaît cependant, comme l'avait fait de Vries, que les membranes plasmiques sont des couches nettement différenciées et de véritables organes de la cellule.

Nemec en 1900, vient apporter un appui aux idées de Pfeffer par des expériences sur la formation expérimentale de vacuoles dans les cellules entourées d'une membrane. Il provoque en refroidissant brusquement des racines de *Vicia Faba*, la formation dans le plasma de nucléoles extra-nucléaires et il constate que plus tard ceux-ci se trouvent dissous et remplacés par une vacuole. Il lui paraît certain qu'il s'agit là de vacuoles néoformées et *il en résulte que, d'après lui, les vacuoles peuvent naître « de novo »* non seulement dans un plasmode de Myxomycète, ainsi que l'avait montré Pfeffer, mais également dans les cellules entourées d'une membrane.

Dans les années suivantes, on peut constater le succès des critiques de Pfeffer. Personne n'admet que les membranes vacuolaires puissent constituer un organe spécial et la doctrine de Pfeffer sur la formation de ces membranes par contact règne sans conteste. L'adoption des idées de Pfeffer entraîne naturellement le rejet des autres conceptions de de Vries et la

thèse de la permanence et de la présence constante des vacuoles dans les cellules.

Il n'est pas inutile de donner quelques indications sur les idées qui ont eu cours depuis cette époque au sujet des vacuoles.

Y. Delage, dans son Traité sur la structure du protoplasme et sur l'hérédité, range les vacuoles parmi les organes accidentels du cytoplasme. Elles semblent en effet, dit-il, de simples lacunes se formant là ou ailleurs indistinctement, aux endroits où s'accumule le suc cellulaire. Mais il n'est pas certain qu'il en soit ainsi (p. 44). Ce doute final montre que le célèbre biologiste ne dédaignait pas complètement la théorie de de Vries.

Strassbürger, en Allemagne, adopte avec une légère variante les idées de Pfeffer et rien ne montre mieux quelle pouvait être l'opinion des botanistes sur les vacuoles à cette époque, que la citation suivante empruntée à l'un des ouvrages de Strassbürger (1898). « Les vacuoles écrit-il, sont des productions du plasma alvéolaire. Pour leur formation, il n'est pas nécessaire d'invoquer des processus formateurs spéciaux, car il suffit que chaque lacune de plasma alvéolaire s'arrondisse, se délimite nettement et s'accroisse en une vacuole. Les vacuoles ne sont donc pas, pour ainsi dire, des néoformations, car elles sont déjà préformées à l'état de lacunes du plasma alvéolaire, mais elles ne sont pas non plus des organes spéciaux du protoplasme, car leur origine prend sa racine dans l'architecture lacunaire commune du plasma alvéolaire ». (Strassbürger, die pflanzlichen Zellhäute, 1898, p. 522). Par conséquent pour Strassbürger les vacuoles résultent de l'agrandissement d'espaces lacuneux primitifs, faisant partie à l'origine de la structure normale du protoplasme. Sa conception des vacuoles dérive donc directement de la *théorie du protoplasme alvéolaire* dont il était le défenseur.

Van Tieghem, dans son Traité de Botanique (1891, p. 16), décrit ainsi l'évolution des vacuoles. « A mesure qu'une

cellule grandit, son protoplasme, *plein à l'origine*, se creuse, comme le protoplasme général du corps dans la structure continue, d'abord de vacuoles remplies de suc ; puis il forme un réseau de bandelettes ; enfin, il se réduit ordinairement à une couche pariétale.... ».

Van Tieghem admet donc le principe de la néoformation des vacuoles au sein du protoplasme. C'est d'ailleurs actuellement encore l'idée régnante et les traités les plus récents n'admettent pas la permanence des vacuoles (Scharp. Introduction to cytology, 1921) ; (Chodat, Principes de Botanique).

Les dernières années sont marquées dans l'histoire du système vacuolaire par d'importantes découvertes : Ce sont les recherches de M. P. A. Dangeard qui ouvrent la voie à d'intéressantes perspectives. Nous avons déjà dit dans l'introduction comment M. P. A. Dangeard, par la méthode des colorations vitales, était arrivé à des résultats entièrement nouveaux en ce qui concerne les vacuoles végétales : c'est lui qui découvrit que dans les méristèmes, les vacuoles présentent fréquemment un aspect filamenteux, dont la forme se modifie sans cesse. Il n'eut aucun doute dès le début de ses publications, sur le rattachement de ces éléments spéciaux au système des vacuoles, car il vit tous les cas intermédiaires, qui existaient entre elles et les vacuoles normales et il suivit de bout en bout leur évolution (P. A. Dangeard, 1916).

Ses travaux se distinguent par conséquent de ceux de M. Pensa, lequel est un zoologiste, qui vit et figura quelque peu après M. Dangeard, des systèmes en réseau dans les cellules végétales ; M. Pensa crut que ces réseaux étaient dus à la précipitation sous l'influence des réactifs qu'il employait (acide osmique par exemple) et lorsqu'il les observa sur le vivant, il crut qu'il s'agissait encore là d'un phénomène de précipitation analogue se produisant naturellement et normalement dans les protoplasmes (*réseaux colorés par l'anthocyane*). M. Pensa ne crut pas qu'il s'agissait d'un stade normal du système vacuolaire (Pensa, 1917).

M. Guillermond, qui en 1914 observa des réseaux colorés par l'anthocyane dans les folioles du Rosier, ne se rendit pas compte non plus qu'il s'agissait du système vacuolaire. Il pensa que les filaments et les réseaux qu'il voyait sur le vivant étaient des *chondriocontes. Ceux-ci élaboreraient les tannins et les pigments anthocyaniques, lesquels se déverseraient plus tard dans les vacuoles.* Trompé par ses convictions acquises sur le rôle des *mitochondries*, il croit à tort qu'il s'agit là d'une nouvelle manifestation de l'activité de ces organites.

La découverte des états filamenteux et réticulés du vacuome et leur interprétation exacte, leur description comme éléments vacuolaires et la démonstration de leur évolution en vacuoles, sont donc dues incontestablement à M. P. A. Dangeard. Il est nécessaire d'y insister, car c'est là un des faits les plus marquants de la cytologie et même de la biologie morphologique actuelle (1).

Les travaux de M. Dangeard ont eu ce résultat en particulier, d'ôter une grande partie de son importance à la *théorie du chondriome*, dont M. Guillermond est en France un des partisans les plus autorisés. Nous allons exposer rapidement l'état actuel de nos connaissances sur le chondriome, car cette question s'est trouvée mêlée à celles des vacuoles dans ces derniers temps.

Théorie du chondriome.

La théorie du chondriome qui a fait beaucoup parler d'elle dans les vingt dernières années, a pris son origine et toute son importance en Allemagne à la suite des travaux de Altmann, Benda et surtout de Meves. C'est Meves qui lui a donné la forme d'une explication générale des différenciations cellulaires aussi bien chez les Végétaux que chez les Animaux : c'est

(1) On trouve dans un travail de Bensley publié en 1910 dans un périodique américain, une indication sur la découverte d'un appareil canaliculaire dans le méristème de l'Oignon, au moyen d'une méthode de fixation spéciale ; c'était une observation de grande valeur, mais malheureusement isolée.

pourquoi il est ordinairement regardé comme chef d'école par la plupart des « *Mitochondristes* ».

Il est d'usage d'attribuer la découverte des *mitochondries* à Altmann qui mit en évidence en 1890 dans les cellules animales, des granules et des filaments *auxquels il attribua un rôle important dans la production des sécrétions*. Le mémoire d'Altmann est orné d'un grand nombre de belles planches en couleurs très démonstratives, qui représentent des « granula » et des filaments onduleux, observés soit dans des cellules vivantes, soit dans des cellules fixées et colorées par des méthodes spéciales (fixation à l'acide osmique, au formol, au sublimé ; coloration à la fuschine acide et différenciation à l'acide picrique).

Altmann n'est pas le créateur du mot de mitochondrie : c'est Benda qui désigne un peu plus tard de ce nom, des grains, des filaments et des chaînes de granules qu'il met en évidence au moyen d'une méthode particulière, différente de celle d'Altmann, (fixation par du Flemming fort, puis par un mélange d'acide pyroligneux et d'acide chromique, mordançage dans une solution de sulfalizarinate de soude, coloration au cristal violet).

Benda crut avoir découvert dans les éléments qu'il nomme mitochondries, un nouvel organe cellulaire ; il pensa qu'elles étaient en relation avec une propriété motrice de la cellule et *qu'elles n'avaient pas de rôle dans l'élaboration des sécrétions*.

Les premières recherches de M. Meves sur les mitochondries datent de 1900. Il étudie la formation d'un corps découvert par Von la Valette Saint-Georges en 1867 dans les spermies des insectes, le Nebenkern. Ce corps se constitue à partir de grains ou cytomicrosomes, qui sont déjà présents dans le spermatocyte. Ces grains pour M. Meves correspondent aux mitochondries de Benda. Sa conclusion est donc que le Nebenkern des spermies provient des petites mitochondries granuleuses des spermatocytes et il en donne pour preuve une série vraiment convaincante des stades de transition.

En 1904, M. Meves signale pour la première fois les mitochondries chez les végétaux. Il croit à cette époque avoir trouvé un organite nouveau de la cellule végétale, comparable aux éléments qu'il a décrit antérieurement dans la cellule animale. Mais c'est en 1908 que l'auteur donne les grandes lignes de la *théorie mitochondriale,* dont il s'efforcera de vérifier l'exactitude dans tous ses travaux ultérieurs. Cette théorie sera le point de départ d'une série de recherches effectuées soit en Allemagne, soit à l'étranger.

Dans ce mémoire M. Meves montre, que dans l'embryon de Poulet toutes les cellules ont entre elles au début beaucoup d'analogies. Leur cytoplasme ne montre encore aucune des différenciations des tissus adultes (fibrilles musculaires, conjonctives, nerveuses, etc.) mais il renferme de nombreuses mitochondries granuleuses et surtout des éléments très allongés, onduleux, se colorant très fortement et d'une manière homogène par l'hématoxyline ferrique (*chondriocontes*) ; les uns et les autres de ces éléments sont des *chondriosomes.* M. Meves émet l'idée que toutes les différenciations qui se produisent dans la suite de l'évolution, lorsque les diverses cellules embryonnaires évoluent en tissus variés, proviennent, quelle que soit leur hétérogénéité future, de la métamorphose d'un seul et même élément du cytoplasme embryonnaire, le chondriosome. Ceux-ci donneront ainsi, en se transformant, les fibrilles musculaires, les fibres du tissu conjonctif, les neurofibrilles, etc.

Dans un autre ordre de modifications, ils donneront aussi les divers produits de sécrétion que l'on observe dans les cellules, comme par exemple les graisses, les boules vitellines, etc. et aussi les pigments. Ainsi les vues premières d'Altmann seraient exactes.

En un mot, *tous les produits de différenciation par lesquels s'accuse le travail constructif ou élaborateur de la cellule auraient pour origine les éléments du chondriome.* C'est également au cours de ce travail que M. Meves émet l'hypothèse du rôle des mitochondries dans l'hérédité. Leur présence cons-

tante dans les éléments sexuels est pour lui une preuve de cette fonction importante.

La méthode employée par M. Meves pour mettre en évidence les mitochondries est la suivante : Fixation au Flemming (renfermant une quantité réduite d'acide acétique), coloration à l'hématoxyline ferrique.

Une partie des conclusions de M. Meves concernant le rôle des mitochondries, n'était donnée à cette époque que comme une hypothèse très probable dans l'esprit de l'auteur.

Dans les années suivantes un grand nombre de chercheurs et M. Meves lui-même, pensent montrer l'exactitude de ces vues. Ce sont les travaux de M. Duesberg sur la formation des myofibrilles, de M. Hoven sur l'origine des neurofibrilles et sur l'élaboration des grains de sécrétion, de MM. Policard et Mulon sur l'origine des pigments, de M. Meves (1910 à 1915), etc.

En France, M. Regaud (1911) émet une théorie qui s'apparente à celle de Meves. Pour lui les *mitochondries sont les agents de l'intussuception élective*, c'est-à-dire de l'introduction dans la cellule des substances amenées par le sang. En même temps, ce sont des fixateurs électifs et des condensateurs. C'est une formation mitochondriale puissamment développée qui, selon toute vraisemblance, est l'agent sélecteur, introducteur et élaborateur des substances qui doivent passer par la cellule (fonction électique et pharmacopexique des cellules).

Recherches vitales sur le chondriome.

Certains auteurs ayant émis des doutes sur la réalité des mitochondries et supposant qu'elles pouvaient être des « artefacts », quelques travaux sont faits dans l'intention de déceler les mitochondries dans la cellule vivante (1).

MM. Michaelis (1900), Laguesse, Laguesse et Debeyre (1912), réalisent des colorations vitales de tissus animaux variés,

(1) Pour avoir un exposé plus complet de la question se reporter au chapitre spécial concernant les colorants vitaux.

(glandes salivaires, foie, etc...) au moyen de vert Janus. Ils signalent que ce colorant a une affinité spéciale pour les mitochondries, qui fixent le colorant et se détachent ainsi dans le cytoplasme de la cellule vivante. M. Laguesse y voit une indication au sujet du rôle d'*éclectosome* attribué par M. Regaud aux mitochondries. M. Cowdry, par la même méthode, colore les mitochondries des globules sanguins de l'homme (1914).

MM. Lévi, (1916) et Léwiss (MR et WH) (1915), observent les mitochondries dans les cellules vivantes d'embryon de Poulet cultivées « in vitro ». Ils colorent ainsi des filaments onduleux, souvent ramifiés, dont la forme est très instable et qu'ils assimilent aux chondriocontes décrits par M. Meves. Ces observations tendent donc à montrer que les mitochondries ont une grande plasticité, se déformant sans cesse dans la cellule vivante. Ils croient que les mitochondries ne jouent aucun rôle dans les sécrétions, car ils observent à côté d'elles des vacuoles et des globules d'huile qui n'ont aucun rapport génétique avec elles.

Extension de la théorie précédente aux végétaux.

Nous avons vu que M. Meves avait signalé la présence des mitochondries chez les Végétaux ; MM. Pensa et Levitzky corroborent ces résultats. Ce dernier auteur montre en 1911, que chez les plantes, l'un des produits de différenciation des mitochondries est constitué par les plastes ou leucites. C'est également à la même opinion qu'arrive M. Guillermond à peu près à la même époque. Depuis lors, M. Guillermond a consacré aux mitochondries végétales de nombreux travaux.

Dans une première phase de ses recherches, l'auteur fait l'application aux tissus végétaux des méthodes spéciales de fixation et de coloration au moyen desquelles les zoologistes tels que Altmann, Benda, Meves avaient étudié les mitochondries animales.

Le principal résultat auquel arrive l'auteur en 1912, est le

suivant : tous les plastes des Phanérogames ont une origine mitochondriale ; les mitochondries apparaissent donc comme des éléments générateurs de plastes et l'on peut considérer ceux-ci comme des *mitochondries différenciées en vue d'une fonction déterminée*. Mais de plus, étant donné le rôle multiple des mitochondries de la cellule animale, il pense que celles-ci, dans la cellule végétale, doivent avoir un rôle beaucoup plus général que celui de former les plastes et il présume qu'elles contribuent à l'élaboration des produits de sécrétion et de différenciation divers (M. Guillermond, 1912).

C'est là un but qu'il se propose de poursuivre dans l'avenir. On voit comment les recherches de M. Guillermond se relient à celles de M. Meves; ces préoccupations nouvelles vont l'entraîner à des erreurs. Conduit par cette idée, M. Guillermond est amené dans les années suivantes à des recherches sur l'origine des *corpuscules métachromatiques* et sur l'origine d'un pigment *l'anthocyane*.

Les premiers de ces corps avaient été déjà étudiés par l'auteur chez les Cyanophycées (1905), les Bactéries (1902), et chez les Champignons (1908). Ces recherches avaient montré que ce sont des produits de nature azotée, qui sont très abondants dans les filaments des Champignons, où ils semblent constituer une réserve utilisée au moment de la sporulation. A partir de 1912, M. Guillermond indique dans une série de notes que ces produits sont élaborés par des mitochondries (1913, Anat. Anzeiger).

Les *pigments anthocyaniques* sont aussi d'après les travaux postérieurs de M. Guillermond élaborés par les mitochondries. L'auteur le montre d'abord dans le cas du Rosier (1913), puis chez un grand nombre de plantes, d'abord au moyen d'observations vitales, puis en utilisant les méthodes mitochondriales : sur le trajet des chondriocontes, se forment des sphérules du pigment qui vont ensuite se déverser dans les vacuoles. Le tannin se forme de même que l'anthocyane dans des mitochondries. (Guillermond, 1914, 1915) ; les idées de M.

Guillermond trouvent confirmation dans les travaux de MM. F. Moreau (1914) chez les Phanérogames, Mme F. Moreau (1913) chez les Algues, de M. Levitsky (1913) chez les Champignons, de M. Mirande (1916) chez *Azolla*. Elles reçoivent de l'extension de la part de M. F. Moreau en ce qui concerne l'origine de deux pigments, la rhodoxanthine (1914) et la lycopine (1916). Ainsi en 1916, M. Guillermond était arrivé à généraliser le rôle élaborateur des mitochondries. Le chondriome élabore d'après lui, dans la cellule végétale : des produits hydrocarbonés (amidon), des corpuscules albuminoïdes de réserve (corpuscules métachromatiques), des pigments assimilateurs et pigments associés à ceux-ci (chlorophylle, xanthophylle, et carotine), des pigments anthocyaniques et des tannins. Il présume encore le rôle possible du chondriome dans l'élaboration du glycogène des Champignons. La théorie du chondriome atteignait chez les végétaux son apogée.

Système vacuolaire et chondriome.

Pendant l'année 1916, paraissent un certain nombre de notes de M. P. A. Dangeard qui vont contribuer à ruiner cette extension attribuée au rôle élaborateur des mitochondries.

Au moyen de colorations vitales chez les Diatomées, les Algues filamenteuses, et des Champignons variés, l'auteur montre que très souvent les corpuscules métachromatiques ne sont pas préformés dans la cellule et que la substance qui les constitue ou *métachromatine* se trouve ordinairement dissoute dans le suc vacuolaire où elle forme une solution colloïdale. L'action d'un colorant vital ou d'un fixateur comme l'alcool absolu, détermine la précipitation de corpuscules de tailles et de formes variées, (corpuscules métachromatiques), qui peuvent s'accumuler sur les parois de la vacuole ou se montrer animés de mouvements browniens à l'intérieur du suc vacuolaire. Ainsi, la métachromatine ne se montre jamais dans le cytoplasme ou dans le chromatophore des Algues, mais est toujours loca-

lisée dans les vacuoles. Il en résulte qu'elle n'a aucune relation avec les mitochondries (M. P. A. Dangeard, 1916).

Dans deux notes à la Société mycologique, M. P. A. Dangeard complète les résultats annoncés, par l'étude des Levures et des Mucorinées (1916). Peu de temps après, l'origine de l'anthocyane et des tannins faisait l'objet d'une nouvelle communication (1916).

En observant sur le vivant, ou au moyen de colorations vitales de jeunes pétales de *Géranium*, l'auteur arrive à cette conclusion que l'anthocyane et les tannins existent en solution colloïdale dans les vacuoles et n'ont aucune relation d'origine avec les mitochondries. La théorie du chondriome subissait là encore un nouvel échec.

Dans les années qui suivirent, il s'établit entre M. Guillermond et M. P. A. Dangeard, une controverse au sujet des faits précédents. Elle s'est terminée en faveur de M. Dangeard, puisque M. Guillermond s'est rallié à l'opinion de ce dernier au sujet de l'origine des corpuscules métachromatiques et de celle de l'anthocyane. Le rôle élaborateur du chondriome se réduit à la formation de l'amidon, parfois d'huile et aussi des pigments par les plastes qui constituent pour M. Guillermond une variété spéciale de mitochondries. Il en résulte une restriction considérable du rôle du chondriome et de son importance dans les sécrétions.

Poussant plus loin les conclusions de ses recherches, M. Dangeard pense que le rôle des mitochondries a du être fort exagéré également dans la cellule animale. Il pense que, dans ce domaine aussi, on a dû confondre des formations n'ayant entre elles aucun lien génétique.

Dans tous les cas, dit-il, la théorie du chondriome en ce qui concerne la cellule végétale s'effondre, car les différenciations diverses ne prennent pas toutes leur origine dans un élément unique, la mitochondrie, mais proviennent de l'évolution d'appareils distincts, qui sont déjà séparés et sans rapport entre eux dans les cellules embryonnaires (1918).

TRAVAUX SUR LE CHONDRIOME DANS LES CINQ DERNIÈRES ANNÉES.

Dans ses travaux récents, M. Meves ne semble pas avoir eu connaissance des critiques de M. P. A. Dangeard au sujet de la théorie du chondriome. Il reprend en 1917 et en 1918 l'étude des mitochondries végétales et ses travaux sont conçus dans le même esprit que précédemment.

En 1917, il croit pouvoir affirmer que les *microsomes* qui selon certains auteurs, contribuent à l'épaississement de la membrane végétale, dérivent des mitochondries. (Il emploie à cette époque le terme de *plastosome*, au lieu de celui de *chondriosome*). En 1918, il montre que les boules sécrétrices de nature protéique des tubes criblés d'une Liliacée (*Chlorophytum Sternbergianum*) proviennent des plastosomes.

M. Mottier en 1921, croit pouvoir montrer que les cristalloïdes des grains d'aleurone proviennent de la réunion et de la fusion de chondriosomes entre eux ou des produits formés par des chondriosomes qui s'assembleraient à l'intérieur de cavités en forme de vacuoles.

Dans une note à l'Académie, en 1921, nous montrons que cette manière de voir est certainement inexacte dans le cas du Ricin. Les grains d'aleurone appartiennent à l'appareil vacuolaire et n'ont aucun rapport génétique avec les éléments étrangers du cytoplasme. Le cas est le même que celui de l'anthocyane et des tannins : jamais des chondriosomes ne pénètrent dans une cavité vacuolaire et jamais ils ne viennent déverser de produits figurés à l'intérieur d'une partie quelconque du vacuome.

M. Guillermond ayant abandonné l'idée d'un rôle général du chondriome dans l'élaboration des différenciations cellulaires, pense que les mitochondries des Végétaux verts sont de deux sortes ; les unes sont affectées à la fonction chlorophyllienne ; ce sont les *plastes* ; les autres n'ont aucun rôle connu jusqu'à présent, ce sont les *mitochondries inactives*.

MM. Emberger et Mangenot adoptent les idées de M. Guillermond et pensent en vérifier l'exactitude, l'un chez les Pteridophytes, l'autre chez les Algues.

M. Dangeard ayant contribué à renverser l'idée du rôle général du chondriome, n'admet pas que l'on emploie le mot de mitochondrie. Pour lui, une cellule renferme des plastes variés de formes (mitoplastes, sphéroplastes) et de fonction (leucoplastes, chloroplastes, etc..) et des microsomes (ceux-ci doivent correspondre aux mitochondries inactives de M. Guillermond) dont le rôle n'est pas connu.

Il montre que la distinction de ces deux sortes d'éléments est en général facile et qu'ils n'ont pas de rapports entre eux. Voici d'ailleurs les conclusions générales d'un travail récent(1).

Conclusion. — L'essai de généralisation de la théorie de M. Meves chez les Végétaux n'a pas abouti à des conclusions exactes (travaux de M. Guillermond et de son école sur les corpuscules métachromatiques et l'anthocyane en 1914 et 1915, travaux de M. Mottier sur l'aleurone en 1921). Elle a même conduit M. Meves à des conclusions dont il est permis de douter (rôle du chondriome dans l'épaississement de la membrane et la production de sphérules protéiques, chez une Liliacée).

(1) 1° Le *plastidome* et le *sphérome* ont une existence aussi générale que le noyau dans la cellule végétale.

2° Ces deux formations sont nettement indépendantes : elles se transmettent parallèlement à travers les générations successives sans avoir aucun point de contact.

3° Les plastes du *plastidome* se présentent avec des formes très variables (*sphéroplastes*, *mitoplastes*, *discoplastes* etc.) ; ils jouent des rôles variés dans le métabolisme cellulaire (*xanthoplastes*, *carotinoplastes*, *chloroplastes*, etc ; *amyloplastes*, *oléoplastes* etc.).

Les microsomes du *sphérome* sont normalement sphériques (*sphérosomes*) : la forme en bâtonnet est un stade de division ou une déformation (*mitosomes*) ; certains aspects semblent indiquer une transformation possible des microsomes en globules oléagineux (*oléosomes*).

4° Le plastidome et le sphérome existent dans les grains de pollen et dans le sac embryonnaire : leur présence dans l'œuf n'est pas douteuse ; il est nécessaire d'en tenir compte au point de vue de la transmission des caractères héréditaire (C. R. Ac. Sc. 1922).

Nous avons vu le point de départ de la théorie en 1908 dans les travaux de Meves ; le point d'arrivée est tout autre. Grâce aux travaux de M. P. A. Dangeard, on peut dire qu'il ne subsiste plus rien chez les Végétaux de la théorie mitochondriale telle qu'elle avait vu le jour. Il reste cependant acquis une connaissance plus précise d'éléments qui étaient déjà anciennement connus sous les noms de plastes et de granules (1). En ce qui concerne la cellule animale, la question du chondriome n'est pas réglée. La solution sera intéressante par la comparaison qu'elle amènera avec la cellule végétale, mais l'on doit reconnaître qu'à l'heure actuelle, c'est plutôt cette dernière dont la connaissance peut servir de base à des recherches à entreprendre dans le domaine de la zoologie.

A la suite des recherches récentes, le système vacuolaire, son évolution et son rôle ont attiré l'attention plus qu'ils ne l'avaient fait jusqu'ici.

Nous avons pensé, au moment d'entreprendre notre sujet d'étude, qu'il y avait place pour un travail consacré à peu près uniquement au système vacuolaire. Cette idée a été vérifiée en somme, par l'abondance des résultats nouveaux que nous avons obtenus en morphologie et en physiologie cellulaires.

Il s'agissait pour nous de préciser dans des exemples choisis l'évolution du système vacuolaire dans les organes en voie de croissance (bourgeons, plantules), de faire connaître l'évolution morphologique et chimique si possible ; enfin de répondre aux questions qu'il était légitime de se poser au sujet des vacuoles après les travaux de M. P. A. Dangeard : autonomie du système vacuolaire, nature de la métachromasie, persistance dans les graines de l'appareil vacuolaire, cause des

(1) Une partie des granules avait reçu les noms de microsomes, (Hanstein, Zimmermann), mais les microsomes de M. Dangeard ont été définis spécialement par cet auteur d'après les caractères observés dans la cellule vivante et après fixation et coloration par les méthodes mitochondriales. Ce sont de très petits corpuscules, parfaitement sphériques dans la cellule vivante et se colorant en noir par l'hématoxyline ferrique après fixation par la méthode de Laguesse.

aspects pseudo-mitochondriaux observés, comportement du système en coloration vitale et après fixation.

Tous ces problèmes attendaient encore une démonstration au moment où nous avons fait nos premières recherches, et c'est ce qui a engagé M. P. A. Dangeard à nous confier ce sujet ce dont nous lui sommes très reconnaissant. Pendant l'exécution de ces recherches, des travaux parallèles aux nôtres ont été poursuivis par M. Guillermond et par ses élèves MM. Emberger et Mangenot. Cette situation nous a obligé à publier une série de notes préliminaires pour que nos propres observations gardent la place qu'elles méritent.

Voici, exposées aussi impartialement que possible l'ensemble des recherches effectuées pendant cette période. En 1920, nous décrivons l'évolution des vacuoles dans les bourgeons de Gymnospermes où elle était inconnue : elle se montre avec des caractères comparables à celle qui existe chez les Phanérogames et qui ont été mis en évidence par M. P. A. Dangeard. En novembre 1920, une note sur la métachromatine indique que la coloration vitale des vacuoles n'est pas due aux composés phénoliques puisque des vacuoles dépourvues de ces corps se colorent très nettement. La cause de la métachromasie en coloration vitale réside dans l'alcalinité des vacuoles et les tannins n'ont pas une origine mitochondriale, car leur formation ne constitue qu'un épisode des modifications chimiques produites dans le suc cellulaire.

En 1921, un autre sujet est abordé, c'est celui de l'évolution de l'aleurone et de sa transformation en vacuoles pendant la germination. La formation des tannins et de l'anthocyane est encore observée d'une façon détaillée, et nous montrons qu'elle constitue une phase de l'évolution chimique du vacuome.

Plus tard, l'évolution de l'aleurone du Ricin est décrite pendant la maturation et pendant la germination ; la substance fondamentale protéique du grain d'aleurone fixe le colorant vital et se colore métachromatiquement ; elle passe parfois avant de se transformer en vacuoles par des états filamenteux

et réticulés. Quelque temps après, l'aleurone des Graminées fait l'objet d'une autre communication. Enfin nous avons suivi dans le Rosier, au moyen de colorations vitales, l'évolution de l'appareil vacuolaire et la formation du tannin et de l'anthocyane. L'anthocyane succède aux tannins à l'intérieur du vacuome et les tannins eux-mêmes font suite à des substances protéiques colorables vitalement avec métachromasie.

Pendant cette période, les publications de M. Guillermond sur l'appareil vacuolaire des Phanérogames sont nombreuses (1). Ce sont en général des notes très courtes et leur énumération complète ne servirait qu'à montrer les idées successives de l'auteur au sujet des vacuoles et les fluctuations de sa pensée au cours de ses travaux. Nous ne mentionnerons donc que les notes principales (1) :

En 1918, M. Guillermond croit pouvoir assurer que les colorations vitales des vacuoles sont dues aux composés phénoliques qu'elles renferment. La substance décrite comme métachromatine chez les Végétaux supérieurs par M. P. A. Dangeard représente un composé phénolique. Il croit que les éléments signalés par M. Dangeard comme se colorant vitalement représentent des chondriocontes en train d'élaborer un composé phénolique.

En 1919, M. Guillermond revient sur cette question de la métachromatine. Il pense que la substance décrite sous ce nom par M. P. A. Dangeard chez les Phanérogames est un composé phénolique ou tannoïde, ce qui explique son affinité pour le bleu de métylène (p. 677). Il émet l'idée que les éléments filamenteux des vacuoles décrits par M. P. A. Dangeard peuvent représenter des chondriocontes modifiés et il se propose de reprendre lui-même la question des vacuoles qui lui paraît encore très obscure. En 1920, l'auteur consacre plusieurs notes aux vacuoles. Il constate comme l'avait fait M. P. A. Dangeard et nous-même que les vacuoles peuvent se montrer dans les

(1) M. Guillermond a publié plus de vingt notes concernant les vacuoles de 1918 à 1922.

méristèmes sous des formes pseudo-mitochondriales auxquelles il donne le nom de *primordia des vacuoles*. Il abandonne finalement l'opinion que les colorations vitales seraient dues à des composés phénoliques, mais il se refuse à admettre la présence de métachromatine chez les Végétaux supérieurs. (29 Novembre 1920).

En 1921, M. Guillermond publie un assez gros travail dans les *Archives de Biologie* et la question des vacuoles végétales est exposée assez longuement. L'auteur arrive finalement à une conception du système vacuolaire très voisine de celle de M. P. A. Dangeard. Il reconnaît avoir fait fausse route au sujet de l'origine mitochondriale de l'anthocyane et des composés phénoliques, ainsi qu'au sujet de l'origine de la métachromatine. L'auteur tente un essai de synthèse des résultats obtenus concernant les substances vacuolaires, tant en raison de leurs caractères en coloration vitale qu'en raison de leurs propriétés après fixation.

Plusieurs communications concernant les vacuoles ont eu lieu depuis 1921 ; nous les citerons en même temps que d'autres qui n'ont pas trouvé place ici, dans l'historique particulier qui a du être fait avant chaque chapitre.

PREMIÈRE PARTIE

Recherches sur l'évolution des vacuoles et la formation des tannins dans les méristèmes des Gymnospermes.

Indications historiques.

Lorsque nous avons entrepris l'étude du système vacuolaire chez les Gymnospermes, on ne connaissait rien de son évolution dans les divers organes de ces plantes : on ignorait même si le vacuome présentait dans ce groupe des caractères semblables à ceux qui venaient d'être signalés chez les Algues, les Champignons et aussi chez quelques Phanérogames Angiospermes.

Tout d'abord, il nous fut facile de constater que les jeunes feuilles des bourgeons de Conifères (If, Cèdre, Melèze, Abies etc.) se prêtaient très bien à l'emploi des colorations vitales. Mais une question se posa tout de suite : pourquoi les vacuoles se montraient-elles avec un colorant comme le bleu de crésyl, tantôt colorées en bleu, tantôt, mais plus rarement, colorées en violet, c'est-à-dire métachromatiques ? Le problème n'avait pas encore été abordé : le résoudre avait un certain intérêt, car, à cette époque, une controverse s'était engagée entre M. Guillermond et M. P. A. Dangeard sur la question de la métachromatine. M. Guillermond soutenait que la substance vacuolaire des Phanérogames n'avait aucun des caractères de la métachromatine et qu'elle ne se colorait même pas métachromatiquement.

Les colorations vitales provenaient, selon lui, de la fixation

du colorant par des composés phénoliques fréquents dans la cellule végétale.

Nos observations apportèrent la réfutation de ces critiques, en montrant que le phénomène de la *métachromasie* des vacuoles n'était pas un fait accidentel, mais qu'il se produisait régulièrement dans certaines cellules. Nous eûmes bientôt l'occasion de reconnaître que la coloration métachromatique n'avait lieu que dans les éléments les plus jeunes et les moins différenciés du méristème des feuilles, c'est-à-dire dans les cellules embryonnaires. En outre, la comparaison que nous avons faite de l'action d'un autre colorant, le rouge neutre, a montré que ces cellules embryonnaires se teignaient en rouge orangé, ce qui indiquait une réaction légèrement alcaline, tandis que les vacuoles à tannin qui en dérivent, prenaient une teinte rose violacée accusant une acidité marquée. Ainsi, les cellules les plus jeunes des méristèmes, celles qui se colorent métachromatiquement en coloration vitale, doivent cette métachromasie à leur alcalinité.

Cette découverte de l'état plus ou moins alcalin ou tout au moins neutre du milieu vacuolaire dans les cellules de méristème, chez les Gymnospermes, a été pour nous, dans la suite de ces recherches, un guide constant ; nous avons vérifié que c'est une loi presque générale.

A côté de ce problème concernant la réaction du suc vacuolaire, il s'en présente un autre, qui est en étroite relation avec lui, c'est celui du mode de formation des tannins.

C'est pourquoi cette étude peut encore être considérée comme celle de la naissance et de la formation d'un épiderme sécréteur à tannin, et elle est ainsi une contribution à la connaissance du mode de formation de ces composés.

Les tannins, on le sait, sont des corps extrêmement répandus chez les végétaux. Ils donnent lieu à une exploitation industrielle dans les écorces de beaucoup d'arbres non seulement indigènes (Chêne, Châtaignier) mais aussi exotiques (*Rhizophora*, etc...). Ils sont fréquents chez les Conifères ;

tous les arbres étudiés par nous en renferment dans leurs feuilles ; les épidermes sont très souvent entièrement sécréteurs et c'est principalement dans ce tissu que nous avons recherché de quelle manière apparaît le tannin.

Un travail de ce genre sur les tannins n'a été abordé que d'une manière très incomplète, et les principales indications à ce sujet se trouvent dans des travaux déjà anciens (Klerker 1888, Gardiner 1883).

Le tannin des Conifères a été étudié au point de vue chimique, par Braemer : mais sa localisation cytologique n'a jamais fait l'objet d'aucun travail récent à ma connaissance. On n'a pas noté non plus le mode d'apparition d'un tannin dans un point de végétation, avec le lieu de son apparition et les caractères de sa formation rapide ou progressive.

On sait, d'autre part, que ces corps ont été signalés comme dérivant des mitochondries, par M. Guillermond, M. Moreau, et dernièrement par M. Politis : les recherches de M. P. A. Dangeard ont réfuté cette opinion et nous avons vérifié l'exactitude de ses vues, en ce qui concerne les Gymnospermes.

Il est nécessaire de donner maintenant quelques renseignements sur la technique des colorations vitales qui a servi pour ces recherches, puis nous décrirons l'évolution des vacuoles dans l'If, premier exemple sur lequel ont porté les observations chez les Conifères ; l'évolution des vacuoles sera décrite ensuite dans les autres types.

Technique des colorations vitales.

On considère ordinairement que l'observation de la cellule vivante n'est possible que dans des cas assez limités. Lorsqu'il s'agit en outre d'observer des cellules colorées vitalement, il est bien évident qu'on se heurte à des difficultés plus grandes encore que celles qui résulteraient d'un simple examen direct, car l'action du colorant n'est pas immédiate ; elle doit souvent

être prolongée, ce qui risque fort de désorganiser et finalement de tuer les éléments que l'on désire observer.

C'est pourquoi le choix des objets pour l'examen en coloration vitale a été longtemps assez restreint.

Pfeffer a utilisé à cet effet des plantes assez variées, dont il a observé surtout les épidermes, à cause de leur situation superficielle ; les épidermes des jeunes racines se prêtent très bien à ces expériences et il n'a tenté que plus rarement de colorer vitalement les jeunes organes aériens.

M. P. A. Dangeard a beaucoup élargi le mode d'emploi des colorants vitaux, en montrant qu'on peut colorer des organes aériens (jeunes feuilles, jeunes pétales, etc...) lorsque ceux-ci sont encore très jeunes et que l'épiderme est encore perméable, ou bien en utilisant la pénétration du colorant qui se fait peu à peu par les surfaces de section des petits objets placés dans le bain colorant. Il a fait ainsi des colorations chez les *Geranium* et *Pelargonium*, les *Asparagus*, etc... Tous les jeunes organes étudiés par lui s'étant montrés colorables vitalement, il a conclu à la généralité du phénomène chez les Phanérogames. En outre, M. Dangeard colorait vitalement les levures, les filaments et les spores de champignons variés et de nombreuses algues (Chlorophycées, Phaeophycées, Chlamydomonadinées).

Lorsque nous avons fait nos premiers essais de coloration vitale, nous avons employé la même technique, qui avait réussi à M. P. A. Dangeard : elle consiste en une immersion de durée variable des objets vivants, dans une solution plus ou moins concentrée du colorant vital.

Une des difficultés réside dans l'appréciation de la concentration optima, car on ne peut donner une règle absolue en cette matière qui dépend beaucoup des exemples sur lesquels on opère, et aussi du colorant vital employé. Ainsi, le rouge neutre étant peu toxique, peut servir avec une concentration assez forte sans inconvénients (1/5000). Le bleu de méthylène et le vert Janus seront au contraire employés très dilués (1/100.000).

D'autre part, il arrive fréquemment que les solutions de rouge neutre préparées d'avance se précipitent d'elles-mêmes, ce qui les met hors d'usage, et il est pratiquement commode de fabriquer sa solution au moment de s'en servir, en jetant un peu de poudre colorante dans une petite quantité d'eau. En opérant de cette façon, il faut apprécier au jugé la concentration optima Celle qui réussit dans le plus grand nombre de cas, correspond à une solution de bleu de crésyl ou de rouge neutre variant entre 1/1000 et 1/10.000.

Les solutions faibles, au 1/100.000 et même au 1/1.000.000, ont été préconisées par Pfeffer. Ceci ne convient que pour des colorants à grand pouvoir tinctorial comme le bleu de méthylène qui possède encore, dilué au 1/100.000, une coloration très appréciable (une goutte de solution placée sur lamelle a une teinte bleue très nette) ; au contraire, une solution de bleu de crésyl à la même concentration est à peine teintée (une goutte sur lamelle paraît incolore). Il en est de même pour le rouge neutre. Ces deux colorants n'ont d'ailleurs pas été employés par Pfeffer.

Pour les teintures vitales, les matières colorantes qui peuvent être utilisées sont nombreuses ; nous en donnons plus loin la liste, avec les caractères de leur coloration dans un chapitre spécial ; les deux principaux sont le rouge neutre et le bleu de crésyl. Lorsqu'on a en vue seulement de mettre en évidence les vacuoles, il est préférable de se servir d'un ou deux colorants reconnus comme étant les meilleurs ; employés dans ce but, le bleu de crésyl et le rouge neutre donnent toute satisfaction et nous leur avons donné la préférence sur tous les autres.

Lorsque nous avons étudié de jeunes feuilles, il nous a paru qu'il était à peu près inutile de réaliser un milieu isotonique parfait pour observer les cellules vivantes. En effet, les jeunes feuilles entières ou les fragments de feuilles peuvent être examinés dans l'eau ordinaire sans aucun inconvénient ; dans ces conditions, tant que les membranes ne sont pas

lésées, la cellule est protégée et peut rester vivante pendant des heures sans aucune altération, ne laissant filtrer l'eau et les colorants qu'avec une extrême lenteur. La plupart du temps même, la pénétration du colorant n'a pas lieu à travers les épidermes intacts et se produit seulement par la région coupée de l'organe : si l'on veut alors colorer vitalement certains éléments particuliers, il faut faire une incision appropriée dans les tissus et amener ainsi les cellules dont on veut obtenir la coloration, assez près d'une surface de section. Par cette région, l'eau et le colorant pénétreront suffisamment pour amener au bout de quelque temps, la coloration des éléments que l'on a en vue.

Un exemple illustrera cette manière de faire. Chez le Rosier, il existe dans les jeunes folioles, des cellules situées principalement à l'extrémité des dents, dont le contenu cytoplasmique est très épais et le vacuome invisible : il est très intéressant, par conséquent, d'en obtenir la coloration vitale. Or, si l'on place une foliole dans une solution d'un colorant vital, celui-ci ne passe qu'au niveau de la surface de section et ne réussit jamais à pénétrer au travers des membranes intactes. Il en résulte l'impossibilité à peu près complète d'obtenir par ce moyen la coloration vitale des dents qui sont trop éloignées d'une surface coupée, car si l'on prolonge le séjour dans le bain colorant, il se produit bien à la longue une entrée du colorant, mais elle coïncide avec la mort ou l'altération de la cellule.

Au contraire, si l'on fait une section passant très près de la base des dents, il sera facile de produire la coloration des cellules embryonnaires qui se trouvent à l'extrémité ou à la base de certaines dents.

Ces indications peuvent paraître superflues ; cependant, ce sont parfois des artifices de ce genre qui permettent de réussir là où d'autres ont échoué.

Le temps nécessaire pour obtenir une coloration vitale est très variable : il dépend principalement de la perméabilité des

objets étudiés et de la nature du colorant employé. Il faut parfois plusieurs heures pour obtenir un résultat important et avec certaines teintures spéciales (vert Janus) un contact de vingt-quatre heures avec le colorant peut être nécessaire.

La méthode des colorations vitales qui vient d'être exposée soulève certaines objections qu'il faut examiner.

Réalité des images fournies par la méthode des colorations vitales.

On fait quelquefois aux colorations vitales le reproche d'altérer la cellule et de donner ainsi des images artificielles des éléments cellulaires.

Il est possible que certaines colorations vitales employées par les zoologistes, aient donné lieu à des « artefacts », car l'observation de la cellule animale vivante et non altérée est difficile et demande l'emploi d'un liquide conservateur spécial tel que l'eau salée physiologique, ou un autre milieu, rendu isotonique des cellules qui y sont placées.

En outre, la membrane généralement mince et très perméable des cellules animales, les rend plus sensibles que les éléments végétaux aux variations des conditions de milieu. Pour toutes ces raisons, il se peut que certaines colorations dites « vitales » effectuées dans les tissus animaux, ne soient en réalité que des colorations « postvitales », c'est-à-dire faites dans des cellules légèrement altérées.

Cependant le cas doit être assez rare, car il existe une sorte de compensation à tous ces inconvénients : ainsi, la perméabilité des membranes, nuisible à une étude prolongée dans un milieu qui ne serait pas rigoureusement isotonique, se prête d'autre part à une rapide pénétration et fixation du colorant, ce qui permet de réduire beaucoup le temps de l'observation.

En ce qui concerne la cellule végétale, la revue des principaux travaux permettra de se rendre compte de la valeur de la méthode.

Pfeffer, le premier en date, a obtenu la coloration vitale, soit

du cytoplasme, soit surtout celle des vacuoles adultes. Dans le premier cas, la coloration était diffuse et donnait des résultats assez peu nets ; dans le second cas, le plus souvent réussi, les vacuoles étaient évidemment colorées dans leur état normal et sans modification, car la cellule restait capable de plasmolyse et les mouvements du protoplasme continuaient à s'effectuer. Pfeffer a remarqué, en outre, que lorsque la mort survenait, le noyau et le cytoplasme, jusqu'alors incolores, se teignaient aussitôt, et l'on a ainsi un criterium de la vie et de la mort de la cellule.

Les recherches de M. P. A. Dangeard ont porté principalement sur de jeunes organes aériens. Les formes vacuolaires qu'il décrit (filaments, réseaux) sont bien des états normaux et réels, car on peut les observer parfois sans aucune coloration, *lorsque le vacuome est réfringent ou lorsqu'il est coloré par l'anthocyane.*

Par conséquent, lorsque ces formes s'observent après coloration vitale, dans des cellules qui ne montraient rien auparavant, on peut bien affirmer leur existence réelle. D'ailleurs, ainsi que nous le verrons, les réseaux se retrouvent parfois après fixation, sous forme de minces canalicules incolores.

Les recherches de M. Guillermond, qui font suite à celles de M. P. A. Dangeard et portent sur des objets analogues, confirment la même opinion et la réalité des stades d'évolution vacuolaire observés par M. P. A. Dangeard n'a pas été contestée.

Les mêmes conclusions peuvent être tirées de nos propres études vitales : elles conduisent, comme nous le verrons, à des résultats positifs aussi nets, que ceux donnés par les méthodes de fixation ordinaires. Au fur et à mesure que les questions se poseront, elles seront discutées au cours du travail ; cependant, il est bon d'indiquer ici les principales garanties dont on peut s'entourer.

Il est toujours nécessaire, avant coloration vitale, de faire un examen direct et immédiat des cellules vivantes. Avec un peu d'habitude, on arrive à voir ainsi, dans presque tous les cas,

le noyau, dont le contour est ordinairement très visible. Lorsque sa limite n'est pas nette, sa place est toujours indiquée par une zone de réfringence spéciale, très visible lorsqu'on fait varier rapidement la vis de mise au point.

Les plastes sont généralement visibles, surtout lorsqu'ils sont amylifères, car ils possèdent alors une réfringence accusée due à l'amidon ; les microsomes très petits sont, pour cette raison difficiles à voir, bien qu'ils soient toujours très réfringents.

Les vacuoles se voient bien lorsqu'elles sont de grande taille ; dans les méristèmes, elles sont parfois sous forme de filaments ou de réseaux très réfringents (vacuoles tannifères), ou colorées naturellement (vacuoles anthocyanifères). Très souvent, par contre, dans les méristèmes, elles sont à peu près complètement invisibles, parce qu'elles ont la même réfringence que le cytoplasme. Il faut alors, pour les voir, faire une coloration vitale ou une fixation suivie de coloration.

On peut donner les raisons suivantes du peu de dommages causé aux cellules par une coloration vitale réussie :

1° La cellule reste douée de mouvement et les granulations du cytoplasme continuent à se déplacer normalement (mouvement des microsomes).

2° Les divers éléments cellulaires, noyau, plastes, microsomes, cytoplasme, demeurent incolores : lorsque l'altération survient, elle se manifeste aussitôt par la coloration du noyau.

3° Le cytoplasme et le noyau conservent leur aspect homogène ; au contraire, lorsque la mort intervient, il se produit une précipitation qui se révèle très nettement par une apparence granuleuse de ces éléments.

4° L'appareil vacuolaire lui-même s'il est constitué par une substance visqueuse, ce qui est souvent le cas dans les éléments jeunes, se déforme et subit des modifications incessantes du fait des mouvements normaux du cytoplasme (ces déformations sont comparables à celles qu'on peut observer sur un vacuome réfringent).

CHAPITRE PREMIER.

Évolution des vacuoles chez l'If (Taxus baccata).

ART. I. — ÉVOLUTION VACUOLAIRE DANS L'ÉPIDERME DES FEUILLES (*Fig. 1 et Pl. I, fig. de 1 à 10*).

Nous avons cherché à observer de très jeunes feuilles et le point végétatif lui-même chez l'If de façon à connaître les premiers stades des vacuoles. Pour cela, nous avons étudié des bourgeons cueillis à diverses époques de l'année. Nos recherches ont pris pour type l'If, parce qu'il est facile de s'en procurer des bourgeons et parce que les feuilles sont presque planes, ce qui facilite l'observation.

C'est ainsi que les jeunes feuilles ont pu être examinées entières, dans une goutte d'eau ou dans une goutte de la solution du colorant vital.

A. **Coloration vitale**. — Elle a été réalisée au moyen du *bleu de crésyl*, du *bleu de méthylène* et du *rouge neutre*. Ces colorants ont montré une action inégale. C'est avec le rouge neutre que la réussite est la plus aisée; le bleu de crésyl est presque aussi commode et il est supérieur au bleu de méthylène qui pénètre difficilement dans les cellules embryonnaires.

B. **Caractères du vacuome dans le point de végétation**. — Il n'est pas très facile d'isoler le sommet du point végétatif, et, lorsqu'on a réussi à le faire, il faut encore obtenir la pénétration du colorant vital dans les cellules.

Cette assez délicate opération a été réussie pour les premières ébauches foliaires qui prennent naissance à la base du

cône végétatif. (*Fig. 17, Pl. V*). Elles sont complètement dépourvues de tannin, comme le cône lui-même et le vacuome des cellules se colore en orangé par le rouge neutre, ce qui indique une réaction basique.

La substance vacuolaire est assez abondante, mais sa consistance doit être assez épaisse, car elle prend des apparences de réseaux dont la forme varie et se montre très irrégulière (*fig. 10, pl. V*).

Dès que l'on s'éloigne un peu de la base du point végétatif et qu'on observe les premières petites feuilles individualisées, on remarque l'apparition du tannin dans la pointe de la feuille, puis le long de la nervure médiane. Ces petites feuilles ont alors de 0 mm. 5 à 2 mm. de longueur, et leur forme est lancéolée, assez différente, par conséquent, de celle qu'elles auront plus tard (*fig. 19, pl. V*).

Déjà, sans aucune coloration, sur la feuille vivante, on note deux sortes de cellules dans l'épiderme. Il existe d'une part, des *cellules sécrétrices* à grosses vacuoles réfringentes, qui sont des cellules tannifères déjà formées ; elles sont surtout abondantes au sommet de la feuille. Les autres cellules sont plus petites, plus allongées, et elles se divisent plus activement. Elles sont groupées en îlots répartis dans tout le limbe, mais, à la base de la feuille, elles sont en majorité. On remarque à leur intérieur un gros noyau occupant une grande partie de la cavité cellulaire et quelques granules brillants dans le cytoplasme, qui correspondent, les uns aux microsomes, les autres aux plastes.

Elles paraissent absolument dépourvues de vacuoles. Ce sont des *cellules embryonnaires*, dont le nombre diminue graduellement à mesure que la feuille grandit, parce qu'elles se transforment en cellules tannifères ; dans le sommet du point végétatif, au contraire, on trouve uniquement des cellules à caractères embryonnaires ne renfermant pas trace de tannin.

En somme, en examinant une feuille suffisamment jeune, on observe de la base au sommet, l'évolution de l'épiderme

tannifère à partir d'éléments embryonnaires comparables à ceux du sommet végétatif ou des premières ébauches. Ceci résulte de ce que la feuille d'If possède un *mode de croissance basipète*, c'est-à-dire que la feuille s'accroissant sans cesse par sa base où se trouvent les éléments jeunes en voie de division active, les éléments les plus anciens se trouvent reportés sans cesse vers son sommet. C'est pendant cette évolution que se produisent d'intéressantes transformations du vacuome.

C. **Vacuome des cellules embryonnaires**. — Le vacuome est invisible sur le vivant, parce que sa réfringence ne permet pas de le distinguer du cytoplasme (*fig. 16, pl. X*). On a donc l'impression que ces éléments embryonnaires ont un cytoplasme plein, où les vacuoles manquent complètement.

Pour se rendre compte de l'existence du vacuome, il faut absolument avoir recours aux colorations vitales, car nous verrons qu'après fixation, il est impossible de le différencier d'une manière satisfaisante.

Les colorants vitaux mettent en évidence, avec la plus grande netteté, de petits grains et surtout des filaments contournés de façon irrégulière et variable ; ces éléments sont très fins et de la taille figurée pour les mitochondries. On les trouve souvent groupés aux deux pôles de la cellule où le cytoplasme est plus abondant, et ils y forment parfois des filaments enchevêtrés. Très fréquemment, l'ensemble du vacuome de la cellule figure un réseau, dont les éléments sont extrêmement ténus et voisins de la limite de la visibilité ; néanmoins, comme ils sont colorés fortement, ils se détachent très nettement sur le fond incolore. Les trabécules qui passent entre le noyau et la membrane dans la zone cytoplasmique la plus mince, dessinent par leur ensemble une sorte de corbeille périnucléaire (*fig. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, pl. I*).

D. **Caractères chimiques du vacuome**. — Il est remarquable de constater une différence de coloration très nette

entre les vacuoles sécrétrices à tannins et les débuts vacuolaires des cellules embryonnaires.

Les cellules tannifères se teignent toujours en bleu avec le bleu de crésyl et le bleu de méthylène, en rose avec le rouge neutre (*fig. 9, pl. I*). Cette dernière coloration indique un contenu vacuolaire dont la réaction est, soit neutre, soit légèrement acide (*fig. 1 et 2, pl. I*).

Au contraire, le vacuome des cellules embryonnaires se teint en violet avec le bleu de crésyl et le bleu de méthylène, et en orangé ou brun avec le rouge neutre (*fig. 8, pl. I*). Cette dernière observation montre que le contenu vacuolaire est légèrement basique. Ce phénomène de virage de teinte que nous avons constaté dans les cellules jeunes est un phénomène de *métachromasie*. Il ne peut être dû, dans le cas présent, qu'à une différence de réaction d'alcalinité du vacuome.

Cette raison s'impose d'elle-même pour le rouge neutre qui est un indicateur coloré très sensible : elle doit aussi jouer pour les autres colorants (1).

Nous avions cru, au début, que la teinte violette prise par le bleu de crésyl, pouvait être due à la petitesse des filaments colorés qui se montraient sous une épaisseur très faible. Il n'en est rien, car nous avons observé plus tard des vacuoles déjà grandes et qui prenaient cependant une teinte violette. La coloration spéciale du vacuome des cellules embryonnaires est donc due à sa réaction basique.

E. **Réaction des tannins**. — Nous avons cherché à savoir si ce vacuome, renfermait déjà des produits tanniques : nous avons, pour cela, traité de jeunes feuilles fraîches par une série de réactifs.

Toutes les réactions des tannoïdes se sont montrées négatives ; les meilleures indications à cet égard sont fournies par l'acide osmique, et surtout le bichromate de K à 3 o/o qui n'altère pas sensiblement la cellule et qui a l'avantage de ne pas

(1) Se reporter au chapitre spécial où nous discutons de la métachromasie.

colorer les microsomes comme l'acide osmique : toute chance de confusion est donc écartée ; il ne faut pas se dissimuler qu'il s'agit là d'une recherche très délicate, car on opère sur de très petites quantités de substance, à cause du faible volume des éléments du vacuome dans ces cellules jeunes.

Néanmoins, l'absence de composés tanniques ou phénoliques doit être acceptée sans aucun doute dans ces éléments, et voici pourquoi : lorsque la cellule embryonnaire évolue vers un élément tannifère, l'apparition du tannin est progressive et tous les intermédiaires existent et s'observent, entre la cellule dans laquelle les réactifs ne montrent aucune sécrétion et celle où ils précipitent et colorent quelques granules de produits tanniques. Or, à cette échelle d'évolution chimique, correspond exactement une échelle de teinte avec le rouge neutre qui donne successivement une coloration orangée, puis brune, puis rouge brique, puis rose. Il n'est donc pas douteux que le tannin apparaît comme une substance surajoutée à une autre substance fondamentale dont la réaction est alcaline. Cette substance fondamentale dont la nature est certainement protéique, représente pour nous la *métachromatine*, telle que l'a définie M. P. A. Dangeard, c'est-à-dire une matière existant dans toutes les vacuoles et caractéristique du système vacuolaire.

Cette substance existerait à l'état concentré dans les éléments jeunes du vacuome, elle se diluerait peu à peu et s'incorporerait d'autres éléments pendant la croissance et l'évolution de la vacuole.

Le vacuome des cellules embryonnaires a une forme très instable. Les éléments filamenteux et les réseaux se modifient en effet constamment sous l'influence des mouvements créés par le métabolisme.

L'irrégularité même de ces formes, leur variété, sont bien propres à nous déconcerter : on ne peut manquer d'être frappé de l'absence d'ordre que révèlent les déformations de l'appareil vacuolaire. Là, rien ne peut être prévu à l'avance et

nous n'avons pas une idée bien nette des raisons qui font qu'un trabécule se rompt ou qu'une anse d'un filament se redresse ou s'enroule. Si l'on considère le vacuome comme un élément mort de la cellule et simplement comme le dépôt d'une certaine quantité de substance plastique dans le cytoplasme, il faut se représenter les déformations de cet appareil comme une image négative en quelque sorte des déformations du cytoplasme lui-même.

C'est pendant la croissance des feuilles qui a lieu au printemps, que les cellules embryonnaires se transforment en cellules sécrétrices à tannins. L'apparition du tannin se fait peu à peu, comme nous l'avons vu, et elle peut être suivie au moyen de réactifs sensibles comme l'acide osmique à 1 o/o ou le bichromate à 3 o/o. On peut encore retracer les étapes de cette formation au moyen des colorations vitales au bleu de crésyl ou au rouge neutre, car, dès que le vacuome renferme une petite quantité de tannins, il n'y a plus métachromasie, et la teinte prise par l'appareil vacuolaire est la teinte naturelle du colorant, (bleu pour le bleu de crésyl et le bleu de méthylène, rose pour le rouge neutre). — Pendant cette évolution, des couleurs intermédiaires s'observent entre la teinte métachromatique et la teinte naturelle. Ce sont des violets bleus pour le bleu de crésyl et des rouges brique pour le rouge neutre.

Quant à l'évolution morphologique du vacuome filamenteux ou réticulé des cellules embryonnaires en grandes vacuoles typiques tannifères, elle s'effectue suivant une marche tout à fait normale qui correspond à celle qu'a décrite M. P. A. Dangeard chez les *Geranium*. Les filaments et les réseaux des cellules embryonnaires se gonflent, s'hydratent, prennent une importance de plus en plus grande dans la cellule. Il se produit en somme une dilatation considérable de tout l'appareil vacuolaire. Les éléments si ténus du vacuome embryonnaire se gonflent énormément, par suite d'une augmentation de la quantité de substance vacuolaire et par suite de l'accumula-

tion intense des produits tanniques à l'intérieur des vacuoles.

Cette évolution se produit chez l'If, à l'époque où les bourgeons se développent en pousses feuillées, c'est-à-dire au mois de mars et d'avril. A ce moment, les feuilles qui viennent de s'épanouir sont très riches en tannin. L'épiderme est alors entièrement tannifère sur la face interne des feuilles (jeune



Fig. 1. — Evolution des vacuoles chez l'If.

1. Portion d'épiderme après action de l'acide osmique; trois cellules embryonnaires sont entourées de cellules tannifères. — 2, 3, 4, 5. Cellules embryonnaires après coloration vitale métachromatique montrant les formes jeunes du vacuome. — 6, 7, 8,9. Cellules après coloration vitale montrant les formes âgées du vacuome qui se sont imprégnées de tannin. — Les petits grains figurés sont les microsomes.

feuille de 5 mm. de long.) et formé de cellules à grandes vacuoles adultes. Il est tannifère en grande partie sur la face externe des feuilles (pointe de la feuille, zone médiane correspondant à la nervure). Il persiste seulement de larges zones sur les côtés et à la base, qui restent encore dépourvues de sécrétion.

Sur des feuilles un peu plus développées d'avril (long. 1 c/m), l'épiderme de la face interne est encore entièrement

tannifère, celui de la face externe est devenu tannifère complètement, sauf pour les cellules stomatiques (1) qui se sont différenciées.

Ainsi il se fait une transformation quasi totale des cellules épidermiques, en éléments tannifères.

Un cas intéressant est celui où le système vacuolaire est disposé en deux masses placées aux deux extrémités de la cellule et qui sont réunies par des trabécules irréguliers dans la zone étroite située entre le noyau et la membrane. Par cette disposition, toutes les parties du système se trouvent en communication les unes avec les autres (*fig. 16. pl. X*).

Lorsque l'évolution vacuolaire est achevée, le noyau rejeté sur le côté est caché en partie par la substance sécrétée, ou bien il demeure dans la partie centrale de la cellule, puis se trouve presque complètement entouré cependant par la masse de sécrétion. C'est la condition qui existe normalement dans les feuilles adultes.

ART. — 2. RECHERCHES SUR LA NATURE DU TANNIN DES FEUILLES D'IF.

Nous avons cherché à reconnaître quelle était la nature du tannin renfermé dans les feuilles de l'If, par des réactions microchimiques. Voici quelle est l'action des réactifs ordinaires des tannins sur des feuilles fraîches :

A. **Acide osmique à 1 o/o ou 2 o/o.** — Il colore en *noir intense* la substance des vacuoles à tannins. La réduction qui se fait au niveau de l'appareil vacuolaire est accompagnée d'une bonne fixation de la forme réelle du vacuome, ce qui rend ce réactif précieux. On constate que le tannin peut apparaître dans le vacuome, alors qu'il est encore au stade filamenteux et l'acide osmique fixe ces réseaux vacuolaires dans tous leurs détails en les colorant en noir : par contre, les cellules

(1) Cette absence de tannin dans les cellules stomatiques paraît être assez générale dans le cas d'un épiderme tannifère (feuilles de Conifères, plantules).

embryonnaires ou les colorations vitales décèlent des réseaux analogues, ne se colorent pas par l'acide osmique, et leur vacuome reste invisible après fixation. La métachromatine que contient ce dernier ne réduit donc pas l'acide osmique ou, du moins, elle le réduit aussi faiblement que le cytoplasme ou le noyau, ce qui ne permet pas de la distinguer de ces derniers.

B. **Bichromate de K à 3 o/o.** — Ce réactif colore en brun la substance vacuolaire des cellules tannifères : il donne une très bonne localisation de ces cellules, mais il fixe moins bien que l'acide osmique les éléments délicats du vacuome : les filaments et les réseaux sont altérés et transformés en petites gouttelettes qui s'isolent. On peut cependant se servir de ce réactif pour obtenir une fixation en même temps qu'une coloration parfaite des formes fragiles du système vacuolaire en l'employant, mélangé à du formol à 40 o/o, dans les proportions indiquées pour le fixateur IV de Regaud (1).

C. **Sels de fer.** — Le chlorure ferrique colore en bleu noir la substance vacuolaire des cellules tannifères, mais ce réactif déforme la cellule, ce qui entraîne une localisation du tannin très imprécise.

Le sulfate de fer a donné de meilleurs résultats.

D. **Réactif de Braemer** (Acétotungstate de Na). — Le réactif est mis en contact pendant quatre heures avec les jeunes feuilles fraîches.

Il se produit une coloration jaune fauve des vacuoles sécrétrices, mais il n'y a aucune coloration dans les cellules embryonnaires.

E. **Réactif de Courtonne** (Acétate neutre de Pb.). — Donne un précipité jaune fauve, un peu orangé, dans les cellules à tannin. Ce réactif fixe bien les cellules qui ne sont pas désor-

(1) Bichromate de K à 3 o/o, 3 volumes ; formol à 40 o/o, 1 volume.

ganisées. Ce résultat est probablement dû à l'acide acétique qui sert à neutraliser et qui reste en excès.

F. **Hypochlorite de soude.** — Ce réactif, au moment de sa pénétration, et avant qu'il n'ait eu le temps de détruire la cellule, communique une coloration orangée immédiate et très nette aux vacuoles des cellules tannifères.

G. **Eau iodo iodurée.** — Il se fait une coloration orangée des cellules à tannins et c'est le suc cellulaire des vacuoles qui prend cette coloration (1).

Dans les cellules cylindriques du tissu en palissade, il n'y a pas d'amidon : si l'emploi de l'eau iodée n'a pas été prolongé, les plastes restent verts tandis que les vacuoles à tannins prennent une teinte orangée.

Cette coloration remarquable peut ne pas être due aux tannins, mais provenir d'autres substances du suc cellulaire présentes (Alcaloïdes, Albuminoïdes) ; une solution alcoolique d'iode ne donne pas une différenciation analogue.

H. **Essais de cyanure de K.** — *Emploi d'une solution concentrée.* — Au bout d'une heure, il n'y a aucune coloration des cellules à tannin ; après 24 heures, pas davantage de coloration, il faut en conclure qu'il n'y a pas d'acide gallique dans les vacuoles.

I. **Essai des réactifs des tannins après l'action des fixateurs.** — L'alcool employé comme fixateur des feuilles dissout rapidement le tannin. Les vacuoles ne donnent plus en effet les réactions caractéristiques, ni avec l'acide osmique, ni avec le bichromate.

Après fixation au formol à 40 o/o, tous les réactifs des tannins peuvent être employés avec succès : le formol conserve donc très bien le tannin et le rend d'ailleurs insoluble, car les feuilles qui ont été ainsi fixées peuvent être ensuite conservées sans inconvénient dans l'alcool. Sur des feuilles ainsi fixées et conservées, on pourra donc plus tard localiser le tannin,

(1) Il s'agit d'une coloration du suc vacuolaire sans précipitation.

soit au moyen de l'acide osmique, soit au moyen du bichromate.

Nous avons d'ailleurs constaté que les vacuoles sécrétrices, dans ces conditions, prenaient à la longue une teinte jaune d'or, ce qui permet de les reconnaître sans aucun autre réactif spécial.

J. **Réactifs colorants.** — Après fixation au formol, les vacuoles à tannins fixent le bleu de méthylène et le bleu de crésyl, tandis que les cellules embryonnaires se distinguent par leur absence de coloration.

Il suffit, pour obtenir cette coloration, de laisser séjourner quelque temps les jeunes feuilles entières dans le colorant. On peut aussi colorer des coupes faites à la main ou au moyen du microtome. Le vert d'iode manifeste également de l'affinité pour les vacuoles tanniques qu'il colore vivement en vert. Ce réactif est précieux pour reconnaître la répartition des cellules sécrétrices sur les coupes de feuilles. On l'emploiera avec avantage en double coloration avec le carmin.

Résumé des caractères microchimiques du tannin des feuilles d'If. (il s'agit de recherches effectuées dans les cellules épidermiques ; pour les autres cellules, nous n'avons pas employé la série complète des réactifs).

	Réactifs	Résultat de leur action.
Sur feuilles fraîches et dans les cellules tannifères.	Sels de fer (perchlorure et sulfate).	Coloration noire.
	Bichromate de K 3 o/o.	Précipitation brune.
	Acide osmique.	Coloration et précipitation noire.
	Acétotungstate de Na.	Coloration jaune fauve.
	Acétate neutre de Pb. (réactif de Courtonne).	Précipité jaune fauve, un peu orangé.
	Cyanure de K.	Rien.
	Hypochlorite de Na.	Coloration orangée très nette.
	Eau Iodo-Iodurée.	Coloration orangée.
	Alcool à 95°.	Dissolution.

Sur feuilles fixées au formol à 40 o/o.	Acide osmique,	Coloration noire.
	Bichromate de K à 3 o/o.	Précipitation brune.
	Bleu de méthylène.	Coloration bleue.
	Bleu de crésyl.	Coloration bleue.
	Vert d'Iode.	Coloration verte.
	Bleupolychrome de Unna.	Coloration bleue.
	Hématoxyline ferrique.	Coloration noire.

Réaction d'acidité. — L'emploi du rouge neutre montre que le produit apparaissant dans les vacuoles à sécrétion est un corps acide, puisqu'il neutralise l'alcalinité primitive du vacuome.

Discussion des résultats.

Le corps dont nous avons suivi la formation dans les vacuoles de l'If, doit être, sans aucun doute rattaché au *groupe des tannins.* L'ensemble des réactions énumérées suffit pour justifier ce rattachement à un ensemble de corps d'ailleurs assez mal défini.

Si nous essayons de préciser la constitution de ce corps, nous rencontrons plus de difficultés. Ce doit être un *composé phénolique* (réaction des sels de fer) et les propriétés réductrices vis-à-vis de l'acide osmique, du bichromate de potasse, font penser à un *phénol polyvalent.*

Les caractères d'acidité nous conduisent aux groupes des triphénols ou des acides phénols, mais ce n'est pas de l'acide gallique (acide triphénol) qui donnerait une précipitation rouge avec le cyanure de potassium (d'après Braemer).

Le caractère de coloration orangée avec l'hypochlorite. indiquerait l'*acide ellagique.* Celui-ci est encore appelé acide bezoardique et il a déjà été signalé chez les Conifères (Braemer).

ART 3. — CELLULES TANNIFÈRES DU PARENCHYME ET TUBES SÉCRÉTEURS

En dehors des cellules épidermiques, il y a encore dans le parenchyme chlorophyllien de nombreuses cellules tannifères.

Enfin, au pourtour du faisceau, flanquant le bois et le liber, on trouve des files de cellules allongées à tannin. Ces éléments ont été décrits par M. G. Chauveaud en 1904 sous le nom de *tubes sécréteurs*. L'auteur leur reconnait une évolution assez compliquée qui serait la suivante :

1° Sur les feuilles très jeunes, encore recouvertes par les écailles du bourgeon, il signale des tubes allongés pouvant dépasser la demi-longueur de la feuille, infra-libériens et supra-ligneux.

2° Pendant l'été, ces tubes se cloisonnent et se transforment en cellules de parenchyme, de sorte qu'à l'automne, on ne trouve plus de tubes sécréteurs.

M. Chauveaud ne donne pas de renseignement sur la nature de la substance sécrétée dans ces tubes, non plus que sur les caractères cytologiques de ces éléments, c'est pourquoi il n'est pas inutile de donner maintenant quelques détails à ce sujet.

Nous avons constaté d'abord que chaque tube sécréteur était formé par *une seule cellule* qui s'est extrêmement allongée sans se cloisonner. La substance sécrété est un tannin qui est contenu dans deux très grandes vacuoles s'étendant jusqu'aux extrémités amincies en pointe du tube sécréteur. Elles sont séparées par une zone cytoplasmique occupé par un noyau arrondi et volumineux, qui occupe une position centrale dans une dépression des deux grandes vacuoles.

En été, on constate des divisions qui vont se multipliant et transforment les tannifères en des files de cellules assez courtes. A partir de ce moment, M. Chauveaud signale la disparition progressive des tubes sécréteurs par suite de leur transformation en cellules de parenchyme et le départ de la substance de sécrétion.

Il peut très bien se produire des migrations de substances à cette époque (1), mais il ne peut pas s'agir en tous cas de la

(1) Les tubes secrèteurs contiennent vraisemblablement d'autres substances que des tannins.

disparition du tannin, car des feuilles cueillies en décembre sont encore très riches en éléments tannifères infra-libériens et supra-ligneux qui dérivent des tubes sécréteurs de l'été.

Ces tubes sécréteurs décrits par M. Chauveaud dans les feuilles de l'If, et que l'on retrouve dans les plantules, correspondent donc à des *cellules tannifères extrêmement allongées*.

Nous les retrouverons avec des caractères analogues non seulement dans les feuilles des autres Conifères, mais aussi et surtout dans les très jeunes plantules où ils forment un système important.

CHAPITRE II

Evolution des vacuoles chez quelques autres Gymnospermes.

LARIX (*fig.* 2, *1*, *2*, *3*, *4*, *5* et *fig.* 11, 12, 13, 14 *pl. I*).

Les états les plus jeunes du vacuome, s'observent de même que dans l'If, sur les jeunes feuilles de l'automne et de l'hiver. Le vacuome de l'épiderme se charge de produits tanniques à un stade précoce du développement des feuilles ; mais une différence avec le *Taxus* résulte de la présence du tannin dans l'assise sous épidermique, où il apparaît plus tôt que dans l'épiderme.

Les cellules qui occupent le sommet du point végétatif lui-même renferment des plastes en bâtonnets et des microsomes.

Le vacuome est invisible et il n'y a pas trace de tannin. Il n'est pas probable que dans ces cellules les plus jeunes les plastes soient déjà amylifères, mais ils le sont très nettement dans l'épiderme des premières ébauches foliaires.

Nous avons obtenu la coloration vitale des cellules précédentes chez le *Larix leptolepis* (*fig.* 14, *pl. I*) : le vacuome se montre sous forme de petites vacuoles sphériques de réaction alcaline ; les autres résultats ont été obtenus chez le *Larix europæa*.

Dans nos observations ultérieures et chez les feuilles les plus jeunes examinées (bourgeons cueillis en octobre et novembre), une grande partie des cellules épidermiques est encore dépourvue de tannin : ce sont des cellules à caractère embryonnaire.

C'est seulement au sommet de la feuille et dans sa partie médiane que le vacuome se montre tannifère. La feuille a sa zone de croissance située à la base, de sorte que les éléments les plus âgés sont au sommet (croissance basipète). Il y a concordance parfaite sous ce rapport avec les résultats observés chez l'If.

Nous commencerons par décrire les éléments vivants et non colorés :

Les *cellules embryonnaires* sont de petite taille et elles sont encore peu allongées. Le noyau occupe la plus grande partie de la cavité cellulaire. Le cytoplasme hyalin et d'apparence homogène renferme des inclusions de deux sortes très faciles à distinguer l'une de l'autre : ce sont des microsomes très petits et arrondis et des plastes en bâtonnets, les uns et les autres reconnaissables sur le vivant grâce à leur réfringence; le vacuome est totalement invisible, car sa réfringence est semblable à celle du cytoplasme.

Les cellules sécrétrices tannifères sont déjà plus grandes, plus allongées ; elles renferment les mêmes éléments inclus dans le cytoplasme, mais leur vacuome très réfringent est visible dans ses plus petits détails sans coloration. Il forme des réseaux de forme instable, et de consistance apparemment visqueuse ; il y a généralement deux masses plus considérables aux deux pôles de la cellule qui sont réunies par des trabécules anastomosés autour du noyau allongé (*fig.* 2, *4*).

Après coloration vitale, on met en évidence le vacuome dans les cellules embryonnaires.

Il se distingue par sa teinte métachromatique (violette avec le bleu de crésyl, orangée avec le rouge neutre). Ce sont des granules, des filaments, des éléments de réseaux, des pelotons très fins. Ces formations ne peuvent pas, bien entendu, être confondues avec les plastes ou les microsomes qui existent à côté d'eux et demeurent incolores (*fig.* 12 *et* 13, *pl. I*).

Ces éléments des cellules embryonnaires sont très variés de forme et se modifient assez rapidement pendant qu'on les

observe dans la cellule qui conserve certainement sa pleine vitalité. Lorsque les éléments du vacuome sont plus riches en

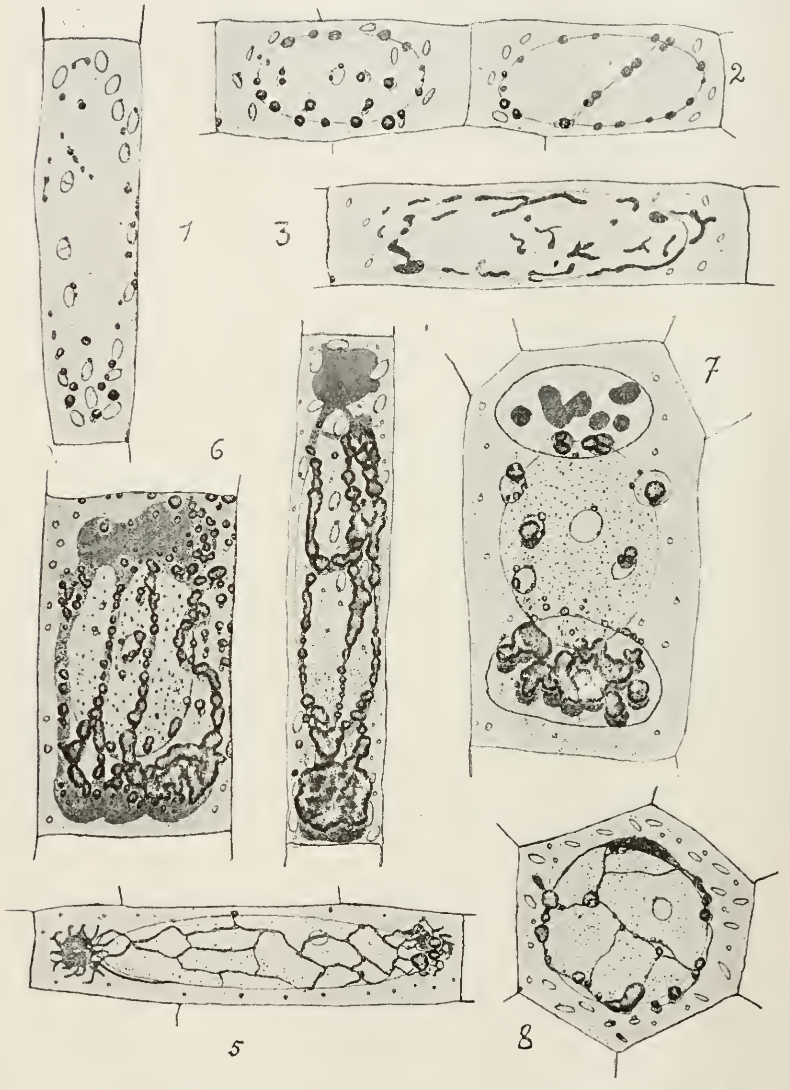


Fig. 2. — Quelques aspects du vacuome, coloré vitalement, chez les Conifères. 1, 2, 3, 4, 5. Cellules épidermiques de *Larix europaea*. Les figures 4 et 5 montrent des réseaux formés par une substance ductile. — 6, 7. Cellules épidermiques de Taxus baccata. 6, vacuome tannifère coloré. 7, vacuome analogue après la précipitation de sa substance. — 8. Cellule épidermique de Gingko biloba.

eau, ils affectent la forme de petites vacuoles rondes ou ovales

et il se précipite fréquemment à leur intérieur de petits granules rouges qui sont animés de mouvements browniens à l'intérieur de la vacuole.

Dans les cellules tannifères de l'épiderme, la coloration vitale n'est jamais métachromatique, par conséquent elle est bleue avec le bleu de crésyl, rouge avec le rouge neutre (*fig.* 13, *pl. I*).

Le colorant vital pénètre également bien dans l'assise de cellules sous épidermiques où le vacuome se colore également en bleu. Cette coloration non métachromatique résulte de la présence de composés tanniques, abondants dès cette époque dans le sous-épiderme (1).

Les mêmes caractères de l'appareil vacuolaire s'observent dans les bourgeons d'une époque plus avancée (février ou mars), mais déjà en février, les jeunes feuilles sont plus riches en tannin et une partie des cellules embryonnaires est transformée en cellules tannifères. Leur vacuome toujours métachromatique est moins souvent en forme de filaments étroits et on observe quelquefois tout simplement de petites vacuoles violettes.

Enfin, lorsque le bourgeon s'ouvre en mars et que les jeunes feuilles s'allongent, leur épiderme se montre uniformément tannifère. L'apparition du tannin se fait donc rapidement, mais elle est progressive, comme le montre, soit la teinte prise en coloration vitale et qui passe insensiblement du violet au bleu, soit l'emploi des réactifs des tannins.

C'est le moment d'indiquer les essais microchimiques sur ces composés. Les réactifs employés ont été l'acide osmique à 1 o/o, le bichromate de potasse à 3 o/o, le chlorure ferrique, l'acétotungstate de soude, le réactif de Courtonne. Tous, ont donné des résultats négatifs dans les cellules embryonnaires ; ils ont fourni au contraire des précipitations caractéristiques dans les vacuoles des cellules sécrétrices à tannin : ces réactifs

(1) Nous n'avons pas observé de feuilles assez jeunes pour trouver des cellules embryonnaires dans le sous-épiderme.

permettent donc de distinguer les cellules embryonnaires des autres cellules et la localisation ainsi faite correspond exactement à celle que l'on établit au moyen de l'observation sans aucun réactif ou après coloration vitale. Les réseaux colorés peuvent être très bien conservés par l'acide osmique (*fig. 13, pl. X*).

Par conséquent de même que chez l'If, les conclusions suivantes s'imposent. Les cellules épidermiques présentent au début du développement un « état embryonnaire » caractérisé par un vacuome de réfringence semblable à celle du cytoplasme, se colorant métachromatiquement par les colorants vitaux, donc de réaction alcaline et dépourvu de composés phénoliques (ou n'en renfermant qu'une infime proportion) : ces cellules se transforment au cours de leurs divisions successives, en éléments sécréteurs tannifères qui ont un vacuome réfringent, visible dans la cellule vivante, et colorable sans métachromasie par les teintures vitales.

Telles sont les conclusions auxquelles nous avons été conduits : elles correspondent exactement à celles que nous avait révélées l'étude du *Taxus baccata*.

ABIES Nordmanniana (fig. 1 à 5, *pl. II* et *fig.* 1 à 5, *pl. XI*).

Nous avons cherché à connaître les premiers stades de la formation des vacuoles et à déterminer le mode d'apparition des tannins comme dans les deux exemples précédents. On s'aperçoit vite que même les très petites feuilles renferment déjà du tannin et qu'il est nécessaire pour connaître son origine de remonter jusqu'aux premières ébauches foliaires qui prennent naissance sur le point de végétation et même jusqu'à ce dernier.

Nous avons réussi à plusieurs reprises, sur des bourgeons cueillis au mois d'août et au mois de septembre, à colorer vitalement le sommet du point végétatif lui-même. Là sont les cellules initiales, qui par leurs cloisonnements, produisent

le tissu épidermique tout entier et c'est là évidemment qu'il faut rechercher l'origine de toutes les différenciations cellulaires.

Lorsqu'on a enlevé les écailles qui protègent le jeune bourgeon, on met à découvert un petit mamelon formé par un axe court. Celui-ci est recouvert sur la plus grande partie de sa longueur par de petites feuilles imbriquées qui le masquent complètement. Le sommet de l'axe est libre et constitue une petite intumescence en forme de cône, à la base duquel s'observent les premières ébauches foliaires.

Il est assez facile de constater, que le sommet de l'axe, ainsi que les premiers mamelons foliaires, ne renferment pas de tannin. Il suffit pour cela de les laisser séjourner dans une solution d'acide osmique à 1 o/o pendant 1/2 heure à 1 heure. On s'assure ainsi que le tannin apparaît bien dans les plus petites feuilles, mais que le cône végétatif lui-même, ainsi que les premières ébauches qui sont à sa base en sont complètement dépourvus.

Pour obtenir une coloration vitale du point végétatif, il faut détacher avec précaution le sommet du méristème avec les premières feuilles et le plonger tout entier dans une solution de rouge neutre. Au bout d'une heure environ, le colorant a pénétré dans un assez grand nombre de cellules situées au sommet et donne lieu à une excellente coloration vitale.

Nous décrirons d'abord les cellules épidermiques qui occupent le sommet végétatif, telles qu'elles se présentent, lorsqu'on les examine directement dans l'eau sans aucun artifice.

Ces cellules sont d'assez grande taille, polygonales, et elles renferment un gros noyau arrondi. Leur cytoplasme est rempli d'un grand nombre de granulations parmi lesquelles on peut distinguer deux sortes : d'une part des corpuscules assez gros, arrondis ou un peu lenticulaires, assez régulièrement groupés autour du noyau, qui sont des *plastes*, d'autre part des granules plus petits toujours arrondis, les *microsomes*. Le *vacuome* est invisible dans les cellules vivantes et nous avons dit précédem-

ment qu'il ne donnait pas les réactions des tannins. On peut donc assurer que le sommet du point de végétation de l'*Abies*, est occupé par des cellules toutes semblables, ayant les caractères de cellules embryonnaires.

Après coloration au rouge neutre, on observe dans toutes les cellules sans exception, un vacuome de couleur orangée, affectant la forme de réseaux très fins et très variés; souvent aussi il n'existe dans le cytoplasme, que des granules vacuolaires rappelant beaucoup les grains d'aleurone par leur aspect général (*fig. 1, pl. II*).

Les mêmes cellules possédant un vacuome identique se retrouvent dans les jeunes feuilles (*fig. 2 et 3, pl. II*); plus tard et à mesure que l'on s'éloigne du sommet du point végétatif, on observe dans l'épiderme la formation de plus en plus fréquente de cellules tannifères aux dépens des précédentes (*fig. 1, pl. XI*).

Les bourgeons que nous venons de décrire passent l'hiver sans qu'il se produise beaucoup de modifications.

Dans les feuilles des bourgeons de l'hiver et du printemps, il y a donc encore des cellules embryonnaires à vacuome non tannifère et métachromatique en coloration vitale, accompagnées de cellules sécrétrices. Les cellules embryonnaires s'observent surtout sur les bords des très jeunes feuilles et à la base, car le mode de croissance est basipète comme dans les feuilles précédentes.

Le vacuome des cellules tannifères comme celui des cellules embryonnaires présente souvent des formes de réseau. Dans le cas des cellules tannifères, ces réseaux sont très visibles sur le frais, car ils sont très réfringents. Leur forme est parfois très contournée et leur substance a une consistance demi-fluide. Ils fixent rapidement le bleu de crésyl et se teignent en bleu, non métachromatiquement.

Enfin nous avons observé plus tard, au mois d'avril, de jeunes bourgeons d'*Abies*. Les feuilles les plus jeunes étudiées, sont complètement incolores et n'ont que 1/2 millimètre envi-

ron de longueur. Le sommet de la feuille est occupé par des cellules à grandes vacuoles et à gros plastes lenticulaires. A la base on peut trouver quelques cellules sans sécrétion (cellules embryonnaires), mais elles sont assez rares. Le vacuome étant très réfringent, on peut observer les détails de sa structure dans la cellule vivante.

Les formes filamenteuses sont nombreuses et il arrive que les cellules contiennent un vacuome uniquement filamenteux. Dans ce cas, les formes vacuolaires à contenu épais et réfringent ont beaucoup d'analogie avec les vacuoles à composés phénoliques du Rosier (*fig.* 7. *pl.* XI).

L'acide osmique à 1 o/o fixe bien les réseaux fins et les filaments tannifères observés sur le vivant. La fixation a lieu en quelques secondes et *elle conserve admirablement les moindres détails* (*fig.* 6. *pl.* XI). C'est l'emploi de l'acide osmique dans des conditions analogues, qui a permis à Pensa en 1917, de figurer des réseaux dans des cellules végétales, sans en reconnaître la nature vacuolaire. On constate de plus, qu'il y a un vacuome très riche en tannin dans les cellules de l'assise sous-épidermique et l'évolution des vacuoles y est en avance sur celle de l'épiderme.

A ce moment de l'année, l'épiderme paraît entièrement sécréteur, et les cellules qui pouvaient passer pour des éléments embryonnaires sur le vivant, montrent, après l'action de l'acide osmique. quelques grains noirs qui correspondent très probablement à des composés tanniques.

Ainsi, par une série d'étapes que nous avons suivies, l'épiderme est devenu entièrement sécréteur dans les jeunes feuilles développées. Il l'est encore sur les feuilles adultes comme il est facile de s'en assurer.

On réussit assez facilement à obtenir la coloration vitale au moyen du rouge neutre, qui donne une très bonne coloration rose de l'épiderme : même après six heures de séjour dans le colorant, il y a des cellules vivantes avec réseau fin coloré, mais dans beaucoup d'éléments se produit à la longue une

précipitation de corpuscules bruns accompagnée d'une rupture des trabécules.

Le bleu de crésyl et le bleu de Nil ont coloré les vacuoles dans les mêmes conditions que le rouge neutre. Quelques indications sont utiles au sujet des autres éléments du cytoplasme. On constate que les microsomes s'observent à tous les états du développement sans modifications sensibles. Les plastes qui sont de petits bâtonnets dans les cellules embryonnaires, se transforment en gros corpuscules elliptiques dans les éléments plus âgés tannifères (*fig.* 1, *pl. XI*). Les plastes ne présentent donc jamais une allure filamenteuse comparable à celle des plastes vermiformes de l'*Iris* par exemple.

PICEA excelsa (*fig.* 6 à 8, *pl. II* et *fig.* 8 à 13, *pl. XI*).

Les jeunes bourgeons de *Picea* ont beaucoup d'analogie avec ceux de l'*Abies*. Ils en diffèrent cependant par le mode d'apparition du tannin, qui se produit ici bien plus tardivement.

De jeunes bourgeons cueillis au mois de septembre, sont déjà formés d'un petit axe, recouvert de nombreuses feuilles ayant une fraction de millimètre de longueur et encore presque incolores. Le point végétatif qui est au sommet, est arrondi et il donne constamment naissance à sa base à de nouvelles feuilles, qui, au fur et à mesure de leur croissance, arrivent à se recouvrir en partie les unes les autres, de façon à prendre une disposition imbriquée (*Fig.* 11, *Pl. XI*).

Si l'on emploie l'acide osmique pour reconnaître la présence du tannin dans le bourgeon, on remarque que le méristème terminal, ainsi que les premières feuilles, sont dépourvus de tannin et que ce corps ne se montre que sur les feuilles les plus grandes et seulement dans les cellules de la pointe de la feuille.

Le bourgeon passe dans cet état l'hiver à l'état de vie ralentie; il se produit seulement un lent accroissement des feuilles et

une légère accumulation de tannin dans les cellules épidermiques pendant cette période.

Au début du printemps, lorsque le bourgeon n'est pas ouvert, il existe un petit cône végétatif assez volumineux recouvert de feuilles à divers états de développement.

Les feuilles les plus petites sont naturellement au sommet et elles se montrent déjà assez riches en produits tanniques. Dans l'épiderme, le tannin est localisé dans toute la moitié supérieure de la jeune feuille ; la base est encore occupée par de nombreuses cellules embryonnaires sans tannin. Plus bas, dans les feuilles les plus grandes, tout l'épiderme est devenu tannifère.

On peut donc chez le *Picea*, comme chez les Conifères précédemment étudiées, connaître le mode d'apparition des composés tanniques, en observant les feuilles des bourgeons cueillis aux diverses époques de l'année.

Nous avons dit que les jeunes feuilles, pendant l'automne, renfermaient encore très peu de composés tanniques dans leur épiderme. Ce tissu dans sa région moyenne est formé de cellules ordinairement allongées à noyau volumineux et d'apparence granuleuse. Dans le cytoplasme qui paraît compact et dépourvu de vacuoles, se voient quelques petits plastes en bâtonnets, très réfringents et quelques microsomes extrêmement petits. Aucune autre différenciation n'est reconnaissable (*fig*. 8, *Pl. XI*) ; vers la pointe de la feuille, les cellules ont le même caractère, mais les plastes sont plus gros, et les microsomes plus nombreux. Enfin les cellules tannifères assez rares, ont un vacuome réfringent bien visible.

Dans l'assise sous épidermique, les cellules sont un peu plus grandes; elles ont les mêmes caractères, mais les plastes sont légèrement colorés en vert au lieu d'être incolores comme dans l'épiderme ; en outre les vacuoles sont visibles comme des espaces clairs assez volumineux à chaque extrémité de la cellule.

Les mêmes caractères s'observent dans les cellules du

sommet du point végétatif lui-même, mais la forme des éléments est assez régulièrement polygonale.

Il est possible de réaliser de bonnes colorations vitales soit du point végétatif, soit d'une jeune feuille. Cependant le rouge neutre employé, pénètre moins facilement que chez l'*Abies* et le système vacuolaire a beaucoup plus tendance à se précipiter aussitôt après la coloration, en petits granules fortement colorés qui se montrent animés de mouvements browniens à l'intérieur des vacuoles; aussi les réseaux vacuolaires qui existent, sont-ils assez instables.

Le rouge neutre met en évidence un vacuome formé par de petites vacuoles arrondies ou des réseaux variés. La teinte prise est orangée, indiquant une réaction un peu alcaline du suc vacuolaire. Lorsque la substance vacuolaire est peu abondante, il peut se présenter des réseaux très fins dans les cellules (*fig.* 8, *pl. II*) ; nous représentons plusieurs de ces réseaux tels qu'ils se montrent au début d'une coloration vitale et dans une préparation réussie : nous avons dit en effet plus haut qu'ils ne se montraient pas très stables et se transformaient au bout de quelque temps en granules et en globules variées (*fig.* 6 *et* 7, *pl. II*).

Les très jeunes feuilles des bourgeons du mois d'avril ont fait l'objet d'observations spéciales, en vue d'y reconnaître le mode de formation des tannins.

Les plus jeunes feuilles examinées ont environ 1/2 millimètre de longueur. La pointe de la feuille est occupée par des cellules à sécrétion donnant les réactions des tannins. L'appareil vacuolaire qui renferme les composés phénoliques est réfringent et tous les détails de sa forme sont visibles dans la cellule vivante : les aspects qu'il présente sont aussi variés que les cellules elle-mêmes, mais peuvent se ramener au type que nous avons déjà rencontré chez les autres Conifères, c'est-à-dire à deux masses vacuolaires situées aux deux extrémités des cellules et reliées entre elles par des trabécules très fins : ceux-ci sont irréguliers et ils serpentent dans l'intervalle cyto-

plasmique assez étroit, existant entre la membrane et le noyau, dans la zone moyenne de la cellule. *Ces trabécules dessinent parfois de véritables arabesques très déliées* qui sont évidemment formées par une substance assez visqueuse (*fig.* 12, *pl. XI*).

Dans toute la deuxième moitié de la feuille, on trouve beaucoup de cellules embryonnaires sans aucune sécrétion visible (*fig.* 12, *pl. XI*, les deux cellules inférieures).

Colorations vitales. — On peut réussir la coloration vitale au rouge neutre des cellules épidermiques, mais comme les membranes se laissent difficilement pénétrer, elle est assez difficile à obtenir.

Le vacuome des cellules à sécrétion tannique a pris une coloration rose et dans les cellules embryonnaires une teinte orangée.

Le bleu de crésyl et le bleu de Nil ont permis d'obtenir également des colorations vitales, mais le bleu de toluidine s'est montré inefficace.

L'acide osmique pénètre rapidement dans l'épiderme et il fixe et colore en noir le système vacuolaire sécréteur. Grâce à la rapidité de la traversée des parois cellulaires, il se produit le minimum d'altération des formes délicates du vacuome et l'on retrouve les trabécules les plus fins fixés et colorés (*fig.* 10 *et* 13 *pl. XI*). On constate facilement ce fait que la proportion de tannin est à peu près semblable dans toutes les parties du vacuome et nous n'avons pas trouvé d'indices montrant un lieu d'élection particulier pour le tannin. Cette conclusion s'explique d'ailleurs, puisque toutes les parties du vacuome sont ordinairement en communication directe entre elles.

CEDRUS Libani (*fig.* 9, *pl. II* et *fig.* 1 à 11, *pl. X*).

Dans les jeunes feuilles de Cèdre il se produit beaucoup de tannin au printemps. Observons par exemple l'épiderme des feuilles du mois d'avril qui sont en voie de croissance et n'ont

encore que 1 mm. à 1 mm. 1/2 de longueur. Un simple examen vital montre que les cellules jeunes sont à la base et que les cellules âgées à grandes vacuoles occupent le sommet de la feuille. Le mode de développement de la feuille est donc le même que dans les cas précédemment étudiés, ce qui permet de suivre de la même façon l'évolution du vacuome, puisqu'il suffit d'examiner les cellules d'épiderme de la base au sommet de la feuille. Malheureusement, il y a déjà du tannin dans toute l'étendue de l'épiderme et l'on ne trouve pas de cellules embryonnaires dépourvues de sécrétion. Les éléments les plus jeunes ont un vacuome en réseau qui est à peine réfringent ; il donne les réactions des tannins et l'acide osmique le colore en noir et conserve bien sa forme. Les réseaux parfois très fins et très délicats, à la base de la feuille, sont de plus en plus épais et riches en tannin vers le sommet et se transforment finalement en grosses vacuoles tannifères, suivant le procédé ordinaire (*fig.* 6 *et* 7, *pl. X*).

De même que dans le *Larix*, l'assise sous-épidermique est entièrement sécrétrice et tannifère et l'évolution du vacuome y est en avance sur celle de l'épiderme. En effet, il y a déjà dans le sous-épiderme un vacuome épais renfermant du tannin en abondance (*fig.* 11, *pl. X*), dans des masses vacuolaires assez volumineuses, alors que l'épiderme de la même feuille contient des réseaux tannifères dont la masse est parfois très minime (Cas identique à celui du *Larix*) (*fig.* 10, *pl. X*).

Nous venons de voir que l'examen des jeunes feuilles du mois d'avril ne permet pas d'élucider le mode de formation du tannin puisque, à cette époque, les assises épidermiques et sous-épidermiques sont déjà entièrement tannifères (1).

Nous avons repris la question sur des bourgeons de Cèdre recueillis au mois de septembre, époque à laquelle ils sont clos et dans un état de vie ralentie qui se prolongera durant tout l'hiver suivant.

(1) Il aurait fallu probablement remonter jusqu'au point végétatif lui-même pour observer le début de la sécrétion de tannin.

On sait qu'il existe chez les Cèdres, de même que chez les Melèzes, deux sortes de bourgeons : les uns situés à l'extrémité des pousses longues produisent des axes allongés portant des feuilles isolées alternes, les autres situés à l'aisselle des feuilles précédentes produisent des axes courts (pousses courtes) portant des feuilles insérées suivant une spire très surbaissée, ce qui les fait paraître verticillées.

Nous avons recherché le mode de naissance du tannin exclusivement sur les bourgeons des pousses longues.

Ces bourgeons, lorsqu'on les dissèque au mois de septembre, montrent déjà un certain nombre de petites feuilles bien développées, disposées en spirale sur la base d'un axe conique. Le sommet de l'axe est libre et forme un cône recouvert et protégé par les feuilles les plus longues (*fig.* 20, *pl.*, X).

Ce point de végétation, accompagné des premières feuilles qui l'entourent, est placé dans l'acide osmique à 1 o/o.

On constate au bout d'un quart d'heure, que l'axe du cône végétatif tout entier a pris une teinte noire, causée par une abondante réduction au contact des tannins. L'épiderme, ainsi qu'un certain nombre d'assises sous épidermiques, ne noircit pas et prend seulement une teinte grise due à la faible réduction habituelle dans les éléments vivants (*fig.* 2, *pl. X*).

La zone des cellules initiales qui occupe le sommet du cône se montre également dépourvue de tannin (*fig.* 1, *pl.* X).

Les premiers mamelons foliaires qui se forment à la base du cône, sont d'abord de simples intumescences dont toutes les cellules sont embryonnaires; mais dès le second cycle de feuilles, il y a un développement abondant de tannin dans l'épiderme et dans le sous-épiderme.

En même temps, une ramification du cylindre central de l'axe se rend dans la feuille, pour en constituer le faisceau conducteur et cette branche apparaît noircie par suite des nombreuses cellules à tannin qui l'accompagnent (*fig.* 1, *pl.* X).

Maintenant que nous connaissons dans ses grandes lignes le mode d'apparition du tannin dans le point de végétation, nous

allons voir de plus près, comment il prend naissance dans les cellules épidermiques et sous-épidermiques.

Le sommet du cône végétatif, de même que les premiers mamelons foliaires, sont occupés comme nous l'avons dit par des cellules embryonnaires. Ce sont de larges éléments polygonaux, hyalins, qui renferment un gros noyau central (*fig.* 8 *pl. X*).

Le cytoplasme est très granuleux et renferme une grande quantité de microsomes arrondis et réfringents et de petits bâtonnets assez courts qui représentent des plastes. Il existe également de petits corpuscules arrondis ou un peu allongés colorés en jaune citron et qui sont probablement des plastes teints par de la xanthophylle, des xanthoplastes.

Le vacuome est invisible dans la cellule vivante, à cause de sa réfringence semblable à celle du cytoplasme. On en obtient la coloration vitale au moyen de rouge neutre, en prenant la précaution d'immerger le point végétatif tout entier dans une solution du colorant. Dans ces conditions, au bout d'une heure ou deux, le rouge neutre a pénétré dans un certain nombre de cellules et s'est fixé sur les éléments vacuolaires (*fig.* 9, *pl. II*).

La figure 9, montre deux cellules du sommet dans le point végétatif, colorées au rouge neutre.

On voit que le vacuome est formé de petites vacuoles rondes, dont le suc vacuolaire est légèrement alcalin, car il donne une teinte orangée au colorant vital.

La substance vacuolaire est probablement dans un état assez fluide, car on observe rarement des dispositions en réseau si fréquentes au contraire chez *Abies* et *Picea*.

L'action de l'acide osmique ne révèle aucune trace de tannin dans ces cellules : seuls les microsomes noircissent légèrement par suite de leur nature un peu oléagineuse.

Dans les premières ébauches foliaires, on n'observe pas de modification à l'état précédent, mais dans les premiers mamelons individualisés, on remarque le début de l'apparition du

tannin. La sécrétion se montre d'abord au sommet des jeunes feuilles (ainsi dans les figures 4 et 5, Pl. I, la zone tannifère est indiquée par un grisé). Les cellules du sommet ont un vacuome en réseau assez épais, qui renferme du tannin en abondance et se colore en noir par l'acide osmique (*fig.* 7. *Pl. I*).

Plus bas, on trouve des étapes diverses de la production de la sécrétion ; ainsi la figure 7 montre trois cellules dont la supérieure a déjà un vacuome tannifère en réseau, tandis que l'inférieure ne montre qu'un petit nombre de grains noirs précipités (1). Enfin, plus près encore de la base de la feuille, il y a des cellules embryonnaires absolument dépourvues de tannin.

La figure 9 montre un des aspects présenté par l'appareil vacuolaire sous l'action de l'acide osmique, à l'époque où il commence à devenir tannifère.

On voit que l'acide osmique fixe en général très bien les réseaux délicats, mais cependant, lorsque ceux-ci sont très fins et renferment encore peu de tannin, au lieu d'un réseau homogène, on observe un réseau de petits granules dus à la précipitation sur place de la sécrétion (*fig.* 9). Les cellules embryonnaires ne montrent pas trace de vacuome et l'on y remarque seulement de petits microsomes oléagineux : (ceux-ci ne peuvent pas être confondus avec des grains de tannin, car ils sont toujours de même taille, ronds et il brunissent par l'acide osmique au lieu de devenir franchement noirs).

Les colorations vitales se font aisément dans ces jeunes feuilles : suivant la règle ordinaire, le vacuome dès qu'il est tannifère, se colore en rose par le rouge neutre. On colore ainsi des réseaux à tannin qui correspondent à ceux que nous avons décrit précédemment dans les feuilles du mois d'avril, mais alors que l'acide osmique fixait en général ces éléments

(1) Il ne faudrait pas déduire de cette observation que le tannin apparaît sous forme de grains, car ces petits granules correspondent à des précipitations à l'intérieur d'un appareil vacuolaire dont la forme peut être très variée.

délicats dans de bonnes conditions, la pénétration du colorant occasionne rapidement l'altération des trabécules, et la précipitation de petits grains rouges dans les petites vacuoles formées, où ils se montrent animés de mouvements.

Dans les premiers mamelons foliaires, le rouge neutre colore des réseaux orangés dans les cellules embryonnaires, mais ceux-ci se montrent également très instables et se résolvent rapidement en granules.

Cette instabilité du vacuome du *Cedrus* est un caractère spécifique, dû à ce que le système vacuolaire, même dans les cellules les plus jeunes, est très aqueux et par conséquent très fluide.

Il n'offre par les mêmes particularités, comme nous l'avons vu, dans l'*Abies* ni même à un pareil degré chez le *Picea*.

GINGKO biloba (*fig.* 12 et 13, *pl. II*).

Les jeunes feuilles du bourgeon en septembre, n'ont que quelques millimètres de hauteur et sont enroulées sur elles-mêmes. Leur épiderme est formé de cellules polygonales aussi longues que larges dont le contenu paraît très épais (*fig.* 12, *pl. II*).

Sans aucun artifice de préparation, on voit très bien le contour du noyau qui est parfaitement sphérique ; les plastes sont nombreux (20 à 50 par cellule), réfringents ; leur forme est celle de petits bâtonnets ou de fuseaux. Ce sont déjà des amyloplastes, car l'eau iodée les colore très fortement en bleu noir. Les microsomes sont extrêmement petits et difficiles à voir ; ils sont mobiles, mais se déplacent lentement. Leur nombre est moindre que celui des plastes et il ne m'a pas semblé qu'il y en eût plus de 10 ou 20 par cellule. Le vacuome est à peu près complètement indistinct.

Les colorations vitales de fragments d'épiderme réussissent bien, soit avec le rouge neutre, soit avec le bleu de crésyl et la coloration se fait avec métachromasie. La forme du

vacuome est celle de sphérules, de filaments et même parfois de réseaux (dont la consistance est certainement demi-fluide *fig.* 12 *et* 13, *pl. II*).

L'essai à l'acide osmique montre qu'il n'y a pas de tannin : le cytoplasme et le noyau prennent une teinte brune : les vacuoles sont invisibles ou bien se montrent comme des espaces clairs : elles réduisent donc moins l'acide osmique que le reste de la cellule (1). Les plastes demeurent peu modifiés, mais les microsomes sont colorés et se distinguent comme de petits points noirs.

Pendant l'hiver, le vacuome des jeunes feuilles présente à peu près les mêmes caractères : il est métachromatique et dépourvu de tannin. Le système affecte souvent dès cette époque, l'aspect de vacuoles assez importantes en dimension, mais de consistance certainement demi-fluide.

La pénétration du colorant vital, surtout du rouge neutre, est très rapide et donne lieu à une coloration intense, orangée ou brique. Les formes en réseaux modifiables sont fréquentes. On distingue en outre aisément les microsomes et les plastes et ces derniers ne montrent jamais de formes filamenteuses.

TORREYA nucifera (*fig.* 10 et 11, *pl. II*).

Les Torreyers sont des arbres appartenant à la famille des Taxinées : ils ont de grandes affinités avec les Ifs. Nous avons recherché quel était le mode de naissance des vacuoles, chez un *Torreya nucifera* planté dans l'école de botanique du Muséum de Paris.

Contrairement à ce qui a lieu chez les arbres précédents sauf le *Gingko*, il ne se forme pas de tannin dans l'épiderme des feuilles. On s'en assure facilement au moyen de l'acide osmique, réactif

(1) Il y a pourtant dans la jeune feuille de Gingko des éléments qui réduisent fortement l'acide osmique ; ce sont des poches sécrétices et de plus, un certain nombre de cellules situées sous l'épiderme et alignées le long des nervures, ont un vacuome en réseau assez allongé qui noircit fortement par l'action de l'acide osmique.

qui permet de déceler de très minimes traces de tannin, sur une coupe transversale d'une feuille adulte fraîche (1).

On constate après action de ce réactif, que seules quelques cellules de parenchyme chlorophyllien se teignent en noir foncé : l'épiderme reste incolore.

Examinons maintenant un très jeune bourgeon cueilli en automne. Au mois de septembre, le bourgeon est encore très petit et ne comprend qu'un nombre assez faible de petites feuilles, situées à la base d'un cône végétatif qui les dépasse longuement (*fig.* 18, *pl. IX*).

Un mois plus tard, l'aspect est légèrement différent, les jeunes feuilles se sont accrues et elles recouvrent presque complètement le sommet du point végétatif ; ce sera la disposition hivernale. Quoiqu'il en soit, le développement des vacuoles est identique dans les deux cas.

Les cellules qui occupent la zone apicale du cône végétatif sont polygonales et lorsqu'on les observe vivantes, il est difficile du premier abord de reconnaître leur structure, car leur cytoplasme est très dense. Le noyau occupe une grande partie de la cellule, mais son contour n'est pas très net et l'on reconnaît seulement sa présence grâce à sa réfringence spéciale. Un grand nombre de petits microsomes, tous arrondis et brillants se distinguent assez aisément. Dans certaines cellules, il est impossible de mettre en évidence des plastes et l'on n'y voit que des microsomes ; dans d'autres, qui sont situées au voisinage, il est au contraire très aisé de reconnaître un certain nombre de plastes réfringents, en forme de petits bâtonnets, qui se trouvent ordinairement sur le pourtour du noyau et comme à son contact.

Le vacuome est totalement invisible dans ces cellules vivantes et le cytoplasme se montre homogène et d'apparence compacte.

Après coloration vitale au rouge neutre, il apparaît dans

(1) Cueillie en septembre.

chaque cellule des filaments, des granules et plus souvent encore un réseau vacuolaire qui fixe avec intensité et d'une manière élective le colorant vital. La teinte prise est rouge orangé, indiquant une réaction légèrement basique. Les filaments et les réseaux sont d'une délicatesse extrême, très fins, modifiables lentement.

Ils ne sont pas pourtant instables, car on peut les observer plusieurs heures sans que la cellule manifeste d'altération (*fig.* 10, *Pl. II*).

Dans les jeunes feuilles qui se trouvent à la base du point végétatif, l'épiderme est formé de cellules allongées, environ deux fois aussi longues que larges. Comme dans le sommet du cône terminal, il y a des cellules dont les plastes sont invisibles et d'autres où on les distingue fort bien : dans tous les cas, il y a des *microsomes*, petits, arrondis et brillants.

Le vacuome, indiscernable sur le tissu vivant, se colore vitalement au moyen du rouge neutre et sa disposition est identique à celle qu'il présente dans le cône végétatif. La substance vacuolaire est encore très peu abondante et forme des trabécules très fins.

Les cellules épidermiques sont très peu épaisses et il arrive fréquemment, surtout si le bain colorant est assez concentré que le tissu est tué rapidement et dans ce cas le rouge neutre se fixe sur le système vacuolaire de l'assise sous-épidermique. Celui ci montre une disposition réticulée qui présente beaucoup d'analogie avec celle du vacuome épidermique, mais la substance dont il est formé est beaucoup plus abondante.

Tout porte à croire que ce vacuome a une consistance épaisse. La coloration prise est le rouge orangé comme précédemment (*fig.* 11, *Pl. II*).

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS DES CHAPITRES I ET II.

En résumé, dans l'étude que nous avons faite des vacuoles d'un certain nombre de Conifères, nous avons vu que deux questions se trouvaient intimement associées. D'une part l'évolution du système vacuolaire dans sa constitution, sa forme, d'autre part l'élaboration des tannins. Ce sont deux aspects du même problème, car les tannins ne se trouvent jamais en dehors du vacuome, où ils apparaissent progressivement au cours du développement.

En observant ces très jeunes feuilles, nous avons trouvé et décrit de très nombreux et très beaux exemples de ces *formes vacuolaires spéciales* découvertes par M. P. A. Dangeard et qui avaient donné lieu à des confusions dans ces dernières années avec les mitochondries. Ces formes étaient inconnues chez les Gymnospermes.

L'évolution du vacuome se produit suivant une loi qui lui est propre. Les formes que présentent ce système paraissent dépendre beaucoup plus de la teneur en eau et des mouvements cytoplasmiques, que de la présence à son intérieur d'une substance particulière, telle que le tannin. En effet, les mêmes formes, en réseaux, en filaments, se rencontrent que le vacuome soit sécréteur ou non. Ces formes sont très modifiables et varient d'un instant à l'autre. Elles échappent donc à une description très précise : leur connaissance n'en a pas moins un grand intérêt, parce qu'elle nous renseigne sur la nature du mouvement cytoplasmique.

En ce qui concerne les tannins, ce travail démontre son

origine vacuolaire et réfute ainsi les idées émises dans ces dernières années sur l'origine mitochondriale de ces corps.

La plupart des Conifères étudiées, (*Taxus*, *Larix*, *Cedrus*, *Abies*, *Picea*), élaborent du tannin dans leurs feuilles de très bonne heure et à un stade très précoce des bourgeons. Ce tannin peut se former dans certaines cellules de parenchyme foliaire, ou dans des cellules très allongées (tubes sécréteurs), sous-épidermiques ou péridesmiques. Il peut être très développé dans l'assise sous-épidermique (*Larix*, *Cedrus*). Il est surtout abondant dans les épidermes eux-mêmes, dont toutes les cellules deviennent tannifères en général (*Taxus*, *Larix*, *Abies*, *Picea*, *Cedrus*).

Le mode de formation des tannins a surtout été observé dans les épidermes, autant en raison de la facilité de l'observation, que de la propriété que possède ce tissu, de devenir entièrement tannifère dans les feuilles adultes. Un autre avantage résulte de la dérivation commune de toutes les cellules, les unes à partir des autres par divisions successives, aux dépens d'une zone de croissance placée à la base de la feuille. Mais les conclusions obtenues au sujet de la formation des tannins dans ce tissu, paraissent assez bien établies, pour que l'on puisse en faire l'application aux autres éléments à tannin des feuilles. D'ailleurs, l'assise sous-épidermique peut être observée vitalement dans les mêmes conditions que l'épiderme et la formation des tannins y présente les mêmes caractères (*Larix*).

Pour observer dans les épidermes des cellules n'ayant pas encore sécrété de tannin, il faut examiner de petites feuilles ayant quelques millimètres seulement de longueur et même quelquefois n'atteignant qu'une fraction de millimètre de longueur (*Cedrus*).

Le sommet du point végétatif lui-même lorsqu'on peut l'observer (*Taxus*, *Abies*, *Cedrus*, *Picea*), (*Larix*, pousses longues), se montre complètement dépourvu de tannin. Il est occupé par des cellules à caractères méristématiques (cellules embryon-

naires). Ces éléments se retrouvent à la base des feuilles les plus jeunes.

Les composés tanniques sont toujours localisés dans le vacuome; pour indiquer leur mode de formation, l'on doit d'abord connaître les caractères du vacuome des cellules embryonnaires. Celui-ci, très peu réfringent, est invisible ou peu visible dans la cellule vivante.

Il est métachromatique en coloration vitale et se colore en jaune orangé ou en rouge brique avec le rouge neutre, ce qui indique une réaction légèrement alcaline. Sa forme est très variable, (filaments, réseaux, petites vacuoles arrondies).

Ces éléments embryonnaires se transforment très rapidement en éléments tannifères; cette évolution est progressive et elle consiste en une imprégnation du vacuome par le tannin où à une modification d'une substance préexistante dans le vacuome.

Le système vacuolaire, plus tard, dans les feuilles âgées, se dilate toujours en réseaux épais et finalement en grosses vacuoles réfringentes remplies d'un tannin abondant. Dès qu'il existe du tannin dans le vacuome, la coloration vitale se fait sans métachromasie et il est très probable que le suc vacuolaire est devenu acide (1).

Dans toutes les cellules que nous avons eu l'occasion d'examiner, il a généralement été possible de mettre en évidence, par la simple observation vitale, trois systèmes d'éléments : des plastes, des microsomes, et un appareil vacuolaire. Les plastes ont été observés à plusieurs reprises dans les cellules initiales, où ils ne présentent pas de formes spéciales, mais sont le plus souvent granuleux ou en bâtonnets. Aucun état onduleux, comparable à celui des « chondriocontes » n'a été constaté.

Ces plastes s'imprègnent de très bonne heure d'amidon qui est généralement abondant dès les premières ébauches foliaires.

(1) Le caractère réfringent du vacuome sécréteur ainsi que sa réaction acide paraissent dus aux composés tanniques.

CHAPITRE III

Comparaison de l'étude vitale avec les résultats que donne la fixation (méthode de Regaud).

Il était intéressant de savoir quels résultats donneraient les méthodes de fixation dans les bourgeons étudiés « *in vivo* » au chapitre précédent.

La méthode suivante *de Regaud* nous a donné de bons résultats pour cette recherche : On place les objets destinés à être fixés dans un mélange de formol et de bichromate (formol à 40 o/o, une partie ; bichromate de K à 3 o/o, trois parties) pendant quatre jours, en ayant soin de renouveler le mélange lorsqu'il se trouble.

Ces pièces fixées séjournent ensuite huit jours dans le bichromate seul (*postchromisation*), puis sont lavées à l'eau courante pendant vingt quatre heures. Après inclusion à la paraffine, elles sont coupées au microtome en coupes minces de 5 μ, puis colorées à l'hématoxyline ferrique suivant Heidenhain.

Cette méthode donne une fixation excellente du cytoplasme des jeunes bourgeons de Conifères. Nous l'avons appliquée d'abord aux jeunes points de végétation du *Cedrus Libani*, cueillis au mois de septembre à l'extrémité des pousses feuillées, puis à ceux d'*Abies Nordmanniana*.

CEDRUS LIBANI.

Plastidome. — Après coloration, nous avons constaté que les feuilles les plus jeunes et le sommet du cône végétatif lui-

même sont formés de cellules à cytoplasme très épais. Les plastes se montrent comme de petites granules ou de petits bâtonnets, mais ne présentent jamais l'allure de filaments flexueux : en un mot ils n'ont pas l'apparence « chondrioconte ». Ceci vérifie absolument les données vitales qui ne nous avaient pas révélé de plastes filamenteux.

Sphérome. — Ce système n'est pas toujours différencié d'une façon parfaite par la méthode de Regaud. C'est le cas pour le Cèdre du Liban où les microsomes ne sont pas nettement fixés et colorés. Comme nous n'avons pas l'intention de faire une étude spéciale de ces éléments, nous nous contentons de signaler ce fait.

Vacuome. — Il est formé par l'ensemble de l'appareil vacuolaire dont nous connaissons déjà si bien l'évolution grâce aux observations vitales. Après fixation, ce système se trouve représenté en général sur les coupes, par des lacunes non colorées ; mais il n'en est pas toujours ainsi et parfois les réseaux vacuolaires se retrouvent intacts sur les préparations et très bien colorés.

Comme ces différences de comportement tiennent à la nature des substances vacuolaires, nous allons décrire successivement le vacuome des cellules embryonnaires, puis celui des cellules tannifères.

A. *Cellules embryonnaires.* — Les cellules les plus jeunes qui occupent le sommet du point végétatif, les cellules épidermiques et les cellules de parenchyme qui ne sont pas sécrétrices, tous ces éléments renferment un vacuome non coloré qui se détache sous forme d'espaces clairs au milieu du cytoplasme.

Or, nous savons par l'observation vitale que toutes ces cellules ont un système vacuolaire dont le suc est épais et de réaction alcaline et que la disposition de leur vacuome est tantôt celle de réseau délié, tantôt celle de petites vacuoles arrondies et indépendantes.

Tous ces aspects peuvent se retrouver sur des coupes fixées et colorées, mais les réseaux vacuolaires étant coupés, ne sont plus représentés en général que par des trabécules assez courts et il serait par conséquent difficile, par cette méthode, d'avoir une idée exacte de la configuration du vacuome. La méthode vitale est donc supérieure dans cette circonstance à la méthode des coupes.

En ce qui concerne la substance vacuolaire elle-même, nous devons reconnaître qu'elle est dissoute en partie par la fixation, puisqu'on ne la retrouve plus sur les coupes colorées. Elle n'a pas disparu cependant en totalité, car, dans bien des cellules, on peut remarquer à l'intérieur des vacuoles de petites granulations noires arrondies. S'il s'agit de vacuoles très petites des cellules méristématiques les plus jeunes, ou encore de canalicules vacuolaires, il devient difficile de reconnaître si les granules en question sont bien intervacuolaires et non pas intracytoplasmique. Dans les cas favorables, on se rend compte très facilement qu'un corpuscule coloré se trouve à l'intérieur d'un espace vacuolaire, mais dans les cellules les plus jeunes et si l'espace vacuolaire est très petit, la distinction devient très ardue.

Nous attirons l'attention sur le fait que les granulations chromophiles du vacuome sont nées par précipitation sous l'action du fixateur, dans une vacuole primitivement homogène Comme ils sont assez clairsemés, il arrive souvent qu'on ne les trouve pas sur une coupe de la vacuole, mais il ne faudrait pas conclure pour cela à l'absence de toute substance colorable dans le vacuome.

Il est donc possible que dans tous les cas où les vacuoles ne montrent aucune coloration et où elles apparaissent comme des espaces clairs absolument vides, il y ait néanmoins une petite quantité de substance chromatique qui n'a pas été rencontrée par la coupe. Nous inclinons à penser que des granules de précipitation vacuolaire, colorables par l'hématoxyline, sont présents dans toutes les vacuoles des cellules embryonnaires.

Ces corpuscules résultent de la précipitation, à l'intérieur du vacuome, d'une substance primitivement à l'état de solution colloïdale dans le suc vacuolaire et cette substance est très vraisemblablement identique, à celle qui a la propriété de fixer les colorants vitaux dans la cellule vivante. M. P. A. Dangeard l'a découverte chez les Phanérogames et l'a comparée à la métachromatine des Champignons et des Algues. Bien que l'assimilation précédente ne doive pas probablement être poussée jusqu'à l'identité complète, il n'en est pas moins certain, et les recherches de M. P. A. Dangeard l'on montré, qu'il y a dans les vacuoles de tous les végétaux, Champignons, Algues, Cryptogames vasculaires, Phanérogames, une substance fondamentale présentant un certain nombre de traits communs et qui donne au vacuome ses principales propriétés.

Nous conserverons donc le nom de métachromatine pour la substance fondamentale du vacuome et nous appellerons corpuscules métachromatiques les granulations formées de cette substance.

B. *Cellules sécrétrices tannifères.* — Les observations vitales nous ont amené à cette conclusion, que les tannins sont élaborés à l'intérieur du vacuome, où ils apparaissent peu à peu au cours de l'évolution que subissent les cellules embryonnaires.

Par la méthode vitale nous n'avions constaté qu'une seule phase dans l'élaboration des composés tanniques ; sur les coupes fixées ont peut distinguer assez nettement deux phases.

Première phase. — Au début des transformations, le vacuome devient colorable par l'hématoxyline dans sa presque totalité comme s'il y avait eu formation d'une plus grande quantité de métachromatine. Suivant l'état du vacuome, à ce moment, on peut observer alors des réseaux vacuolaires colorés en totalité par l'hématoxyline en noir foncé, ayant conservé la forme exacte de ceux que nous connaissons maintenant si bien

grâce à l'étude vitale, (Fig. 11 et 12. Pl. XII). Ou bien, il y a dans le cytoplasme, des sphérules de tailles diverses qui fixent très fortement le colorant : comme ces globules sont légèrement contractés au sein d'une petite vacuole arrondie, il en résulte qu'ils se montrent entourés d'une auréole claire.

Ce sont des sphérules du même genre et de gros bâtonnets qui ont été observés par M. Guilliermond dans le Ricin, mais ce dernier ne signale pas de réseaux vacuolaires colorés dans leur totalité et montrant conservés leurs plus fins trabécules, comme ceux que nous avons observés et que nous venons de décrire dans le Cèdre du Liban.

Nous ferons remarquer à ce propos, qu'il y a là un cas de coloration de l'appareil vacuolaire « in toto », par une méthode mitochondriale : c'est un fait qui n'a pas encore été signalé. Il prouve que la méthode de Regaud ne donne pas une différenciation d'un système d'éléments particuliers, mais qu'elle peut mettre en évidence, suivant les circonstances, des corpuscules n'ayant aucun lien génétique entre eux.

Je crois d'ailleurs qu'il est inutile d'insister plus longuement sur cette question, car personne ne croit plus à la spécificité des méthodes dites mitochondriales, depuis les travaux de M. P. A. Dangeard.

Les réseaux vacuolaires colorés ne sont pas toujours conservés dans leur intégrité comme celui qui a été figuré Pl XII, mais très souvent, on ne retrouve sur les coupes, que des fragments de l'appareil vacuolaire, sous forme de pelotons ou de filaments isolés colorés en noir intense. Ces réseaux s'observent non seulement dans l'épiderme, mais aussi dans les cellules de parenchyme qui évoluent en éléments sécréteurs.

Dans les cellules de parenchyme et surtout dans l'axe du bourgeon, on observe souvent de grosses boules teintes en noir foncé : elles représentent des masses de sécrétion dont le volume est considérable.

Il est facile de se rendre compte en examinant la disposition des cellules sécrétrices et par comparaison avec les résul-

tats des chapitres précédents, que celles d'entre elles qui ont un vacuome ainsi colorable par l'hématoxyline, correspondent à des éléments qui sont déjà tannifères. On les trouve à l'extrémité des ébauches foliaires les plus jeunes ; au contraire sur des feuilles plus âgées, ils sont remplacés par des cellules qui présentent un caractère différent qui est celui d'une deuxième phase de la sécrétion.

Deuxième phase de la sécrétion. — Dans les cellules tannifères dont le vacuome est coloré en noir, on voit apparaître un produit jaune d'or qui se montre de plus en plus nettement.

Les vacuoles ne sont plus colorées en noir foncé, mais leur teinte devient indécise, brunâtre ou jaunâtre. On trouve fréquemment à l'intérieur d'une même cellule, une masse vacuolaire colorée en noir d'un côté du noyau et une autre masse colorée en jaune de l'autre bord, avec dans l'intervalle quelques trabécules rompus.

Dans les cellules plus évoluées, les vacuoles montrent toutes une belle teinte jaune d'or, mais il est toujours possible de remarquer sur le pourtour un liseré de métachromatine coloré en noir par l'hématoxyline.

Interprétation des faits. — L'élaboration du composé tannique dans ces vacuoles peut s'interpréter de la façon suivante.

Dans les cellules jeunes embryonnaires, il n'y a pas de tannin et le vacuome renferme une petite quantité de métachromatine que l'on retrouve précipitée et colorée en noir sur les coupes. Plus tard, il se forme des composés tanniques, mais la vacuole continue à renfermer de la métachromatine et même cette substance est devenue très abondante ; il en résulte que la substance vacuolaire se colore en noir foncé, parce que la teinte jaune naturelle des composés phénoliques précipités sous l'action du bichromate, est masquée par la coloration de la métachromatine.

Enfin, dans les cellules sécrétrices les plus évoluées, la quantité de métachromatine est redevenue très faible et ne forme

plus qu'une mince bordure noire autour des masses jaune d'or des composés phénoliques.

Des observations semblables ont été faites chez *Abies Nordmanniana* et chez *Larix leptolepis*.

ART. 2. — ABIES NORDMANNIANA.

Les observations faites chez l'Abies correspondent presque point par point à celles que nous venons de relater chez le Cèdre.

Nous avons fait des coupes de bourgeons du mois de septembre, alors que les feuilles encore très petites ne renferment pas beaucoup de tannin.

Le vacuome des cellules embryonnaires non sécrétrices, qui fixait le colorant vital et se montrait si souvent sous forme de réseaux variés, ne se retrouve plus sur les coupes qu'à l'état de lacunes claires non colorées. Il est de même rare, que les vacuoles ainsi observées, présentent des granules colorés à leur intérieur, comme c'était le cas quelquefois chez le Cèdre.

Il en résulte que la substance vacuolaire assez épaisse, qui se montrait élective vis-à-vis des colorants vitaux, n'est plus représentée après fixation. On doit la considérer comme ayant été presque entièrement dissoute.

Par contre, dès qu'un composé phénolique apparaît dans le vacuome, celui-ci se teint fortement en noir. Si l'appareil vacuolaire est en réseau, comme c'est souvent la cas, ce dernier peut être entièrement coloré (*fig.* 13, Pl. XII). Il y a concordance parfaite avec les observations faites chez le Cèdre, mais nous avons rarement vu chez l'Abies des réseaux fixés et colorés d'une manière aussi parfaite.

Lorsque les composés tanniques sont abondants, ils apparaissent au sein du vacuome comme des masses jaune brun qui demeurent entourées par une bordure mince colorée en noir.

Les plastes chez l'Abies, comme chez le Cèdre se colorent en

noir par la méthode de Regaud. On les trouve dans toutes les cellules des jeunes feuilles sans exception. Ce sont des grains ou de petits bâtonnets n'ayant jamais une allure filamenteuse. Les microsomes ne paraissent pas s'être colorés au moyen de cette méthode.

ART 3. — LARIX LEPTOLEPIS.

Des bourgeons recueillis au mois d'octobre, ont été fixés dans du liquide de Regaud. A cette époque, les jeunes feuilles contiennent du tannin assez abondamment dans l'assise sous épidermique et dans plusieurs cellules de parenchyme ; dans l'épiderme, seules les cellules du sommet de la feuille sont tannifères.

Les circonstances de la formation du tannin dans l'appareil vacuolaire sont à peu près les mêmes que pour les exemples précédents. Lorsqu'une cellule devient tannifère, il se précipite dans le vacuome une quantité de sphérules qui se colorent en noir par l'hématoxyline. Plus tard, apparaît dans chaque boule de sécrétion un noyau jaunâtre qui reste entouré par une écorce noire.

Enfin, dans les cellules sécrétrices les plus évoluées, les grandes vacuoles se montrent remplies de gros globules jaune d'or, formés par des composés phénoliques. Ces masses de produits vacuolaires sont souvent entourées encore d'une mince bordure noire de métachromatine.

Dans toutes les cellules des feuilles de *Larix*, existent des plastes nombreux. Leur forme dans les cellules jeunes est souvent contournée, filamenteuse, même dans les cellules épidermiques, où pourtant l'observation vitale ne révèle que des plastes en bâtonnets allongés, toujours rectilignes.

Il faut donc admettre que la fixation produit une déformation sensible des plastes et peut donner ainsi à des éléments en bâtonnets allongés l'allure de « chondriocontes ». C'est là une remarque intéressante à noter, car des chondriocontes

flexueux ont été souvent décrits dans des préparations fixées, alors qu'il est plus rare de les observer à l'état vivant (cas de l'Iris et de la Tulipe).

La question de la forme des plastes est d'ailleurs un peu secondaire, car l'on rencontre parfois dans des cellules voisines, dans l'épiderme des feuilles d'Iris par exemple, des plastes filamenteux ou mitoplastes et des plastes globuleux. C'est ce qu'ont montré de récentes études de M. P. A. Dangeard.

Les plastes apparaissent donc comme des éléments assez plastiques, susceptibles de se déformer dans la cellule vivante. Ils peuvent aussi subir ces modifications sous l'action des fixateurs comme nous venons de le montrer.

Dans les cellules adultes qui se trouvent au sommet des jeunes feuilles, tous les plastes chez le *Larix* ont pris une forme globuleuse. A cet état, ils ne sont plus déformés sous l'effet de la fixation.

Nous attirons l'attention sur ce mince liseré noir que l'on constate sur la périphérie des boules vacuolaires de nature phénolique. Il représente un dépôt de métachromatine, qui s'est précipité sur le pourtour de la vacuole, tandis que le restant du suc vacuolaire, constitué par les composés tanniques, s'est coagulé en une masse jaune d'or sous l'action du bichromate.

Ces aspects permettent de comprendre comment les « mitochondristes » ont pu parler de l'élaboration des composés tanniques et de l'anthocyane par des mitochondries. Voyons, en effet, ce que dit M. Guilliermond à leur sujet chez le Noyer ; « les chondriocontes, qui constituent le chondriome dans les cellules les plus jeunes, s'assemblent pour la plupart autour du noyau ; puis ils s'épaississent par suite de l'élaboration dans leur intérieur d'une substance qui, avec les méthodes mitochondriales, apparaît fixée et colorée en jaune, grâce à l'action du bichromate de potassium, qui, comme on le sait, précipite les composés phénoliques et leur donne une coloration jaunâtre. A ce moment, les chondriocontes se montrent donc constitués d'un composé phénolique occupant leur axe et d'une écorce

mitochondriale ». Plus loin il parle de boules de composés phénoliques qui s'isolent entourées par une mince écorce mitochondriale.

Puis, lorsque la boule de composés phénoliques a achevé sa croissance, elle se déverse dans la vacuole et ne tarde pas à se dissoudre dans le suc vacuolaire (Guilliermond (11) 1914).

On se rend compte que cette description est complètement erronée parce que l'auteur interprète comme écorce mitochondriale un simple dépôt chromatique d'origine vacuolaire.

Le même cas se présente pour la formation des corpuscules métachromatiques chez *Pustularia vesiculosa* où M. Guilliermond décrit des vésicules qui se séparent des chondriocontes, émigrent dans les vacuoles et continuent à s'accroître tandis que leur écorce mitochondriale s'amincit peu à peu (Guilliermond (7) 1913).

Dans les recherches récentes de M. Politis sur l'origine des tannins dans la vigne, on peut remarquer une erreur semblable. Les mitochondries se transformeraient en vésicules, contenant à leur intérieur un produit tannique, entouré d'une enveloppe mitochondriale — (*Sur les corpuscules bruns de la brunissure chez la vigne*. 1921).

Il ne me paraît pas impossible que dans la cellule animale on ait pu être induit en erreur d'une façon analogue.

On sait que plusieurs auteurs ont décrit la formation de sécrétions diverses, qui apparaissent au moment de leur élaboration entourées par une écorce mitochondriale. Il pourrait s'agir, dans quelques-uns de ces cas tout au moins, de précipitations, sur la paroi d'une vacuole à sécrétion et non pas de la coloration d'un plaste élaborateur.

En ce qui concerne les exemples étudiés par nous, il est certain que l'étude vitale était nécessaire pour interpréter correctement les phénomènes, car sans cela, rien n'aurait été plus facile que de décrire comme une écorce mitochondriale, ce qui n'est en réalité qu'un dépôt, sur le pourtour d'une sphérule de sécrétion ou sur la paroi d'un vacuole.

DEUXIÈME PARTIE

Recherches sur l'aleurone dans les graines et dans les plantules.

Indications historiques.

L'évolution du vacuome dans les méristèmes des Gymnospermes conduit à des résultats généraux qui sont les suivants : le système des vacuoles qui se développe au moment de la croissance et de la différenciation des tissus, provient dans tous les cas d'un système préexistant d'éléments vacuolaires. Ceux-ci se présentent dans les cellules les plus jeunes, soit sous forme de petites vacuoles arrondies à contenu épais ou fluide, soit sous forme de masses irrégulières de consistance épaisse, soit encore comme des réseaux très variables d'aspects et parfois très fins dont la nature visqueuse apparaît certaine.

Ces états du vacuome paraissent conditionnés, en partie par la vie ralentie des méristèmes durant la saison hivernale, mais surtout par des caractères spéciaux aux méristèmes comme l'abondance du cytoplasme et la faible teneur en eau ; il n'est pas douteux également que la nature de la substance vacuolaire puisse entrer en ligne de compte à un moindre degré. D'autres tissus sont bien connus pour présenter des conditions analogues : ce sont les graines, où les cellules se trouvent dans des conditions de vie ralentie, et de faible teneur en eau. Nous nous sommes proposé de rechercher sous quel état se présentait le vacuome dans les graines et de déterminer son évolution pendant la maturation et pendant la germination.

Déjà, avant de commencer nos recherches, on pouvait présumer que l'état du vacuome dans la graine était représenté

par les grains d'aleurone décrits dans des cas très nombreux.

Ces grains étaient en effet depuis les travaux de Pfeffer, de Wakker, de Werminki, considérés comme dérivant de vacuoles pendant la maturation et comme se transformant de nouveau en vacuoles à la germination. Aussi plusieurs auteurs les envisageaient-ils comme des hydroleucites albuminifères desséchés (Van Tieghem), ou des vacuoles riches en albumines et concrétées par suite du dessèchement.

Mais cependant beaucoup d'obscurité subsistait en ce qui concerne ces corps et leur véritable nature : on n'admettait pas en effet la même origine pour les grains d'aleurone du Ricin formés dans des vacuoles et ceux des Légumineuses formés dans le protoplasme (1). D'autre part, les grains d'aleurone dont l'origine est vacuolaire, proviennent-ils d'une précipitation dans une grande vacuole, ou sont-ils le résultat de la *concrétion* de vacuoles préalablement isolées : au moment où nous avons abordé ce sujet, ces questions étaient ignorées. De même, si la transformation des grains d'aleurone en vacuoles à la germination était généralement adoptée, il ne s'ensuivait pas forcément qu'elles étaient l'origine du système vacuolaire de la plantule. Rien n'empêchait de supposer que d'autres vacuoles prenaient naissance à ce moment en des points quelconques du protoplasme : c'était même là une opinion courante, car la possibilité d'une néoformation des vacuoles était admise sans conteste.

Une citation empruntée à un fascicule récemment paru d'un Traité classique, va nous montrer d'ailleurs quelles sont les idées actuelles au sujet de l'aleurone : les transformations de l'aleurone au cours de la germination sont en effet décrites de la façon suivante : « A ce moment, à mesure que l'eau pénètre dans toutes les cellules de la graine, les grains d'aleurone se gonflent ; puis on constate que le ou les globoïdes augmentent de volume et se morcèlent ; les fragments de ces

(1) Rendle. On the development of the aleurone grains in the Lupin (*Ann. Botan.* 1888).

derniers se répartissent autour du cristalloïde qui se gonfle également, se divise, puis se dissout, sa substance se mêlant à la masse fondamentale du grain. Le grain d'aleurone tout entier perd ensuite son individualité et *se mêle au protoplasma* ; seuls persistent encore, à ce moment, des fragments de globoïdes qui finissent eux-mêmes par disparaître. » (G. Bonnier et Leclerc du Sablon, *Traité de Botanique*, fascic. VI, p. 2007). On voit par la lecture de ce passage quelle étrange conception s'était établie au sujet des grains d'aleurone : autant dire que l'on ignorait complètement leur véritable nature.

Ainsi, au moment d'entreprendre ces recherches sur l'aleurone, cette question se présentait à nous sous un aspect des plus confus. Aucune unité de vue n'avait pu s'imposer au sujet de la véritable signification de l'aleurone; le problème de sa formation dans les graines, de même que celui de son utilisation par la plante germée demeurait encore en partie mystérieux et, de l'avis général, la solution en était très difficile à obtenir.

Les recherches cytologiques de M. Guilliermond et Beauverie, (1908) n'avaient pas apporté de clartés nouvelles en ce qui concerne la nature de l'aleurone. Il était nécessaire en effet, que la notion du vacuome soit introduite et que l'observation vitale pût montrer tous les termes de passage entre l'aleurone et les vacuoles normales.

Les observations que nous avons réalisées au moyen de colorations vitales, nous ont permis d'arriver sur tous ces points à des certitudes, qui permettent maintenant de rattacher l'aleurone d'une manière très satisfaisante pour l'esprit, aux phénomènes d'évolution générale du vacuome.

Nous avons fait nos premières observations sur l'aleurone des Gymnospermes, en prenant pour type le Pin maritime, à cause de ses graines relativement grosses et de sa facilité de germination. Les recherches suivantes ont porté sur l'aleurone du Ricin et l'aleurone des Graminées. Leur étude constituera autant de chapitres séparés.

CHAPITRE PREMIER

Aleurone des Gymnospermes.

L'aleurone des Gymnospermes n'a donné lieu qu'à un bien petit nombre de travaux et ceux-ci sont anciens : les principales indications se trouvent à ce sujet dans Pfeffer. L'auteur a étudié l'aleurone dans la graine et en se plaçant d'un point de vue statique.

Dans l'exposé qui va suivre. nous verrons au contraire quelle est l'évolution de cet aleurone pendant la germination. ce qui forme un sujet entièrement nouveau.

ART. 1. — L'ALEURONE ET SON EVOLUTION PENDANT LA GERMINATION DU PIN MARITIME.

Il est relativement facile d'obtenir une coloration vitale de l'appareil vacuolaire dans une jeune plantule. — Il suffit de l'immerger toute entière dans un bain colorant, (bleu de crésyl ou rouge neutre). aussitôt qu'elle vient d'être recueillie et isolée de son endosperme. — Au bout de quelques minutes, l'épiderme tout entier a pris une coloration pâle, soit bleu pâle ou violette (bleu de crésyl), soit orangée ou rose (rouge neutre) (*fig.* 15 *et* 16, *pl. III*).

Cette coloration vitale rapide indique une remarquable perméabilité des membranes. En faisant ces essais, nous prévoyions un peu ce résultat, car la jeune plantule que l'on isole, se trouve en effet naturellement en mesure d'absorber les liquides par toute sa surface, puisqu'elle est plongée au

sein d'un milieu nutritif qu'elle absorbe peu à peu (endosperme).

Lorsqu'on substitue par l'expérience un liquide colorant au suc nutritif, la plantule continue sa fonction absorbante et le colorant vital pénètre à son intérieur comme le ferait un aliment.

Par cet artifice, on obtient des colorations vitales beaucoup plus facilement que dans les cas étudiés au chapitre précédent.

Lorsqu'on a réalisé ainsi une coloration vitale d'une jeune plantule de Pin et qu'on observe un lambeau de l'épiderme, de l'hypocotyle ou des cotylédons, on constate que les cellules épidermiques bien vivantes, montrent leur système vacuolaire seul coloré au milieu des autres éléments cellulaires. Il suffit alors d'examiner un assez grand nombre de plantules de différents âges, pour connaître l'évolution générale de l'appareil vacuolaire dans l'épiderme au cours de la germination. Nous décrirons ces phénomènes à partir de la graine mûre.

A. Evolution des vacuoles dans l'épiderme.

1 *GRAINE MURE.*

Il est facile d'isoler l'embryon de son endosperme et de le placer dans une solution du colorant vital. La coloration ne réussit pas toujours et si l'on opère sur un lot de graines anciennes on aura souvent des insuccès : dans ce cas, il y a bien pénétration du colorant à travers la membrane, mais le noyau se colore immédiatement en bleu pâle avec le bleu de crésyl, en rose pâle avec le rouge neutre, tandis que le reste de la cellule reste incolore. Cette non-réussite est certainement due à l'état de moindre vitalité présenté par des graines anciennes. En effet, la coloration vitale réussit beaucoup mieux lorsqu'on utilise des graines récentes recueillies dans l'année (1).

(1) Le fait précédent constitue très probablement une coloration vitale du noyau.

Des essais ont été faits pendant l'hiver de 1922 sur des graines de l'année, fournies par la maison Vilmorin et nous avons pu obtenir d'excellentes colorations vitales des grains d'aleurone dans l'hypocotyle et dans les cotylédons. C'est là, notons le, un résultat qui n'a jamais été signalé chez les Gymnospermes. Dans tout l'épiderme de l'embryon, les grains d'aleurone se présentent comme de petits corpuscules arrondis, qui sont répartis en nombre élevé dans un cytoplasme bourré d'huile. Cette abondance d'enclaves donne au cytoplasme une apparence alvéolaire. L'huile dont les globules sont beaucoup plus petits que les grains d'aleurone, reste toujours incolore en coloration vitale, mais le réseau protoplasmique prend parfois une légère coloration diffuse ; quant au noyau, il se détache toujours en clair dans une préparation vitale bien réussie (*fig*, 1 *et* 2, *pl. III*).

La teinte prise par les grains d'aleurone est rouge orangée si l'on emploie le rouge neutre, violet pâle ou quelquefois bleu, avec le bleu de crésyl. Ces colorations indiquent une réaction alcaline de la substance fondamentale.

Aucune inclusion ne s'observe normalement à l'intérieur des grains d'aleurone de l'épiderme et ceux-ci se montrent colorés en totalité et d'une manière uniforme.

On remarque souvent, parmi les cellules épidermiques, quelques cellules mortes dont le noyau est alors teint en rose ou en bleu, suivant que l'on a employé le rouge neutre ou le bleu de crésyl : l'aleurone est alors complètement décoloré. Entre ces cellules dont la vitalité est éteinte, et les éléments bien vivants dont le noyau est resté incolore, il existe des états intermédiaires représentés par des cellules dont l'aleurone est coloré alors que le noyau présente une légère teinte.

Ces éléments, doivent être considérés, comme présentant une vitalité atténuée.

Lorsqu'on observe ainsi une double coloration de l'aleurone et des noyaux, il y a toujours une différence de teinte très nette entre le noyau à propriétés acides (teint en bleu pâle ou

en rose pâle) et l'aleurone à réaction alcaline. (teint en violet pâle ou en rouge orangé).

2. *PLANTULE.*

Lorsqu'une graine est mise à germer, il se produit très rapidement des modifications cellulaires dues à l'arrivée de l'eau. Ce sont d'abord des transformations des grains d'aleurone qui se déforment, s'étirent et s'allongent, par suite évidemment des pressions en sens divers qui se produisent dans le cytoplasme. (*Fig. 4 à 6, Pl. VII*).

Ces déformations sont d'ailleurs lentes au début, mais leur vitesse s'accroît peu à peu à mesure que l'énergie du métabolisme augmente. Ces modifications s'accentuant, les grains d'aleurone se trouvent transformés en minces filaments parfois ramifiés : la minceur de ces éléments est telle, qu'on est obligé d'admettre qu'une partie de la substance des grains d'aleurone de la graine a disparu et a été utilisée ailleurs. (*Fig. 5 et 6, Pl. III*).

C'est dans cet état que nous avons observé pour la première fois le vacuome des jeunes plantules et nous avons hésité à reconnaître dans ces filaments et ces réseaux des éléments vacuolaires, jusqu'à ce que nous ayions pu voir, d'une part leur transformation en vacuoles dans la plantule âgée, d'autre part leur dérivation à partir des grains d'aleurone de la graine.

Ces filaments vacuolaires ne demeurent pas isolés, mais ne tardent pas à se rejoindre pour former ensemble un réseau unique très finement ramifié (*Fig. 7 et 9, Pl. III*). Bien que nous indiquions la marche ordinaire de l'évolution du système vacuolaire, il faut remarquer qu'il n'y a aucune régularité dans les formes prises par le vacuome, pour cette raison bien simple que son état se modifie constamment. Il peut arriver ainsi que des éléments d'un réseau se séparent et s'isolent, puis se soudent à nouveau en une autre disposition.

Cet état du vacuome finement réticulé, comme nous venons de le décrire, s'observe facilement dans les cotylédons d'une

très jeune plantule provenant d'une graine ayant sa coque intacte. On peut l'observer très longtemps dans l'extrémité des cotylédons, car il persiste tant que ces derniers ont un rôle absorbant au contact de l'endosperme, (c'est-à-dire sur des plantules ayant quelques centimètres de long). Au contraire dans la base des cotylédons et dans l'hypocotyle, cet état du vacuome est très passager et il naît rapidement de grandes vacuoles par hydratation du réseau vacuolaire.

Cette transformation a lieu par une série d'étapes faciles à suivre sur une même plantule, qui présente à la fois tous les états du vacuome à partir de la pointe des cotylédons jusqu'à l'hypocotyle. Elle consiste en un gonflement du réseau qui prend une place de plus en plus importante dans la cellule à mesure que l'huile disparaît. *Fig.* 8, *Pl. III*). Il en résulte de grosses masses irrégulièrement lobées, dont on suit les modifications sous le microscope et qui contiennent un suc vacuolaire de plus en plus fluide. *Fig.* 10 *et* 11, *Pl. III*). Sur des plantules de deux ou trois centimètres de long, l'épiderme de l'hypocotyle a déjà de grandes vacuoles aqueuses, uniques par cellules, (*Fig.* 12, *Pl. III*), tandis que, si l'on remonte vers les cotylédons, on observe toutes les phases de l'évolution vacuolaire dont nous venons de parler.

Formation du tannin. — Pendant que, dans l'épiderme des plantules, s'opère cette évolution vacuolaire, on constate à un moment donné l'apparition du tannin à l'intérieur du vacuome. La formation de cette substance débute dans la radicule sur des plantules très jeunes, puis elle se montre dans l'hypocotyle (1); on la voit apparaître plus tard dans les cotylédons dont la base devient d'abord tannifère, puis la partie moyenne, puis enfin le sommet qui reste assez longtemps dépourvu de tannin. Il peut sembler d'ailleurs que l'absence de tannin dans l'épiderme des cotylédons soit en relation avec le rôle absorbant de cette partie de la plantule pendant le développement ; mais ce

(1) Dans l'hypocotyle, il demeure toujours quelques cellules sans tannin qui constituent les cellules stomatiques.

fait a une autre raison, c'est que les cotylédons s'accroissent surtout par leur sommet et il en résulte que les cellules de la pointe sont encore à l'état juvénile, alors qu'un peu plus bas elles se chargent de produits tanniques.

Anthocyane. — La plantule de Pin maritime se colore de bonne heure par l'anthocyane, et lorsque les germinations sont assez avancées et que les cotylédons sont épanouis, les hypocotyles se montrent colorés très vivement en rose intense. L'examen d'une coupe de l'hypocotyle dans la région colorée montre que l'épiderme seul renferme de l'anthocyane, qui est dissoute dans le suc des grandes vacuoles (*fig.* 13 *et* 14, *pl. III*). Nous avons cherché à voir le début de la formation du pigment : nous avons remarqué qu'il apparaissait d'abord dans l'hypocotyle, où l'on commence à trouver des cellules colorées sur des plantules de un centimètre de long, alors qu'à l'œil nu, on ne distingue encore aucune pigmentation. Dans ces plantules très jeunes, l'hypocotyle est déjà tannifère : par conséquent, lorsque le pigment anthocyanique apparait, il succède dans le vacuome aux composés tanniques. On peut en conclure que l'anthocyane résulte d'une modification des tannins des vacuoles dans certaines cellules épidermiques de l'hypocotyle. Des cellules pigmentées apparaissent plus tard, non seulement dans tout l'hypocotyle, mais aussi dans l'épiderme des cotylédons, où la couleur de l'anthocyane est masquée par la coloration verte de la chlorophylle.

3. *DISCUSSION DES RÉSULTATS.*

Nous constatons en résumé, qu'il existe pendant le développement d'une plantule de Pin maritime à partir de la graine des phénomènes d'évolution cellulaire très intéressants. Dans tous les stades de la croissance, nous avons porté notre attention sur l'appareil vacuolaire. Celui-ci est représenté dans la graine par des grains d'aleurone qui forment une réserve utilisée pendant la germination. Dans les très jeunes plantules,

il se fait un brassage et une consommation active de substances, qui entraînent des changements considérables du système. Celui-ci se transforme en un ensemble de filaments ou en un réseau très modifiable au sein du cytoplasme. Puis l'apport de l'eau imprime bientôt à ce système un caractère différent : les réseaux se gonflent, se transforment en grosses vacuoles aqueuses, en même temps qu'un produit de nouvelle formation, le tannin, apparaît à son intérieur et que l'épiderme tout entier de la plantule se transforme en une assise tannifère et plus tard anthocyanifère.

Ainsi, bien que cela soit un peu inattendu, la mise en réserve de l'aleurone dans la graine, la production de tannin puis celle d'un pigment rouge, l'anthocyane, dans les plantules, tous ces modes d'activité se passent à l'intérieur d'une même formation, l'appareil vacuolaire, ou vacuome qui se perpétue à partir de lui-même depuis la graine jusque dans les plantules.

Si l'on ne connaissait pas la dérivation directe de tous ces états du vacuome, il est certain que l'on serait très embarrassé pour les expliquer, car l'appareil vacuolaire se comporte comme un véritable protée dont les modifications sont incessantes.

Dans le cas étudié du Pin maritime, les transformations dans la forme de cet appareil peuvent trouver une explication. D'abord, l'état de grains d'aleurone arrondis et isolés se comprend très bien comme un stade de repos de l'appareil vacuolaire, dans les cellules à l'état de vie ralentie de la graine où les mouvements du cytoplasme sont probablement extrêmement faibles.

Dès que la germination est mise en route (et cela se produit au bout de quelques heures), la reprise des mouvements cellulaires entraîne, avec l'arrivée de l'eau, des déformations de l'appareil qui se transforme en un lacis de filaments, puis en un réseau dont la rapidité des changements de forme accuse un métabolisme intense. Cependant, on constate que malgré

les dislocations que subit cet appareil, dans cet état où l'on reconnaîtrait vainement les grains d'aleurone primitifs, celui-ci ne disparaît pas, mais malgré la diminution de sa masse, assume certainement un rôle très important par suite des réactions chimiques qui peuvent avoir lieu sur sa surface multipliée.

Rôle du vacuome. — Si l'on entreprenait de préciser la fonction de l'appareil vacuolaire à cette période de la vie cellulaire, il faudrait le comparer à un appareil circulatoire ou respiratoire dont la nécessité apparaît à l'intérieur d'un cytoplasme surchargé de gouttelettes d'huile qui sont évidemment autant d'obstacles aux échanges rapides.

Une cellule est en effet un organisme très compliqué malgré ses petites dimensions et qui montre en raccourci les fonctions du corps tout entier.

Les vacuoles ont été envisagées jusqu'à présent presque uniquement sous leur aspect le plus commun qui est celui des cellules adultes : ce sont alors des réservoirs d'eau, de sels, de substances organiques solubles ; considérées comme le siège des propriétés osmotiques, on leur fait jouer un rôle important dans l'absorption des aliments de la plante, dans la réalisation de la turgescence des organes, dans la circulation des substances de cellule à cellule.

Un autre rôle important doit être attribué au système vacuolaire : c'est celui de magasin à réserves qui concentre dans les graines des matériaux principalement azotés. Les grains d'aleurone ne doivent plus être étudiés en eux-mêmes, comme une substance de réserve spéciale aux graines, apparaissant et disparaissant sans laisser de trace à la manière de l'huile par exemple, mais comme un état particulier du système vacuolaire. En effet, après avoir joué ce rôle d'accumulation, le système vacuolaire ne disparaît pas, mais se perpétue dans les cellules, remplissant dans la suite des rôles différents.

Enfin, dans certaines cellules dont la vie est particulièrement

active et où les échanges sont considérables, telles que les cellules des plantules de Pin et autres Conifères et aussi les éléments des bourgeons, le système vacuolaire transformé en un dédale de filaments doit jouer le rôle d'un appareil de liaison entre les diverses parties de la cellule. Et, de fait, on n'observe ces formations filamenteuses des vacuoles que dans des cellules dont la vie est intense et dont le cytoplasme est soit très épais, soit encombré de produits inertes tels que l'huile. Au contraire, ces structures ne me paraissent pas liées à la présence d'un produit particulier dans les vacuoles, car on les observe aussi bien dans un système dépourvu de tannin. Elles n'existent que lorsque le vacuome possède un état physique qui lui donne une consistance épaisse.

Le cas de l'épiderme des plantules de Pin maritime pose un problème assez particulier, c'est celui de l'absorption des réserves, qui sont constituées ici en partie, par l'aleurone de la graine.

Nous nous sommes demandé au début, si les états filamenteux du vacuome dans l'épiderme des cotylédons, n'étaient pas dus à ce rôle d'absorption. On pourrait d'autant plus le croire, que lorsque l'hypocotyle ou la base des cotylédons se trouvent portés en dehors de la graine, où ils ne peuvent évidemment plus avoir de rôle absorbant, leur épiderme n'a plus que des vacuoles évoluées d'assez grande taille et tannifères.

Au contraire. les filaments et les réseaux dépourvus de tannin persistent longtemps dans la pointe des cotylédons. Un moyen se présentait à nous de décider de la question : lorsque la plantule est très petite, les cotylédons sont appliqués les uns contre les autres par leurs faces latérales au contact et l'épiderme de leur face externe se trouve seul en rapport avec l'endosperme et seul il est en mesure d'être traversé par les aliments.

Or, si on détache un cotylédon sur une plantule vivante et qu'on le place dans une solution de rouge neutre ou de bleu de crésyl, on constate que le colorant pénètre seulement

dans l'épiderme de la face externe, alors que les deux autres faces restent incolores. C'est là un fait remarquable, qui montre que les lois de l'absorption d'un colorant vital sont les mêmes que celles des aliments, mais cette expérience prouve surtout qu'il existe une différence très marquée entre les pouvoirs d'absorption des faces d'un même cotylédon (1).

A quoi est due cette différence ? Nous avons pensé qu'elle pouvait provenir du système vacuolaire : mais si l'on colore par un séjour prolongé dans le bain, l'épiderme des faces internes, on trouve des filaments et des réseaux qui fixent le colorant et sont en tous points comparables à ceux de l'épiderme absorbant. Il en résulte que l'inégalité très marquée qui se manifeste dans les facultés d'absorption doit être due surtout à une différence dans la pénétrabilité des membranes.

Dans les lignes qui précèdent, nous avons parlé à chaque instant des tannins et de leur apparition dans les vacuoles, sans préciser par quels procédés nous avions opéré cette localisation. Nous allons maintenant indiquer, quels sont les réactifs qui nous ont servi, et quel parti on peut tirer de chacun d'eux.

4. *LOCALISATION DES TANNINS.*

Bichromate de K à 3 0/0. — C'est le réactif qui donne les meilleurs résultats pour la recherche du tannin et sa localisation dans les tissus et à l'intérieur des cellules.

On peut l'employer seul : les jeunes plantules fraîches sont placées entières ou par fragments dans une assez grande quantité de bichromate ; au bout de quelques heures, l'épiderme prend une teinte jaune brun dans toute l'étendue de la zone tannifère. L'examen au microscope montre des masses jaune brun, précipitées dans les vacuoles de toutes les cellules à tannin, mais on remarque que les réseaux, si fréquents dans

(1) Cette différence de perméabilité aux colorants vitaux s'observe également pour l'embryon de la graine, bien qu'il n'ait pas encore de fonction absorbante marquée.

les cellules vivantes ne se retrouvent plus après l'action du réactif : les trabécules sont rompus et remplacés par des alignements de globules, libres ou précipités dans des vacuoles.

Au contraire, si l'on mélange du formol à 40 o/o avec le bichromate, dans la proportion du fixateur de Regaud, on obtient une image très fidèle du vacuome, dont les réseaux même très délicats sont conservés tels qu'ils étaient dans la cellule vivante. Comme ces réseaux se trouvent colorés en brun par l'effet du bichromate, il en résulte que ce réactif est précieux dans l'étude des cellules à tannin. Nous avons vérifié que la localisation est la même que si l'on emploie le bichromate seul. Enfin, au lieu de faire l'essai des tannins dans le bichromate formol, mélange qui se trouble rapidement, il vaut mieux fixer au préalable des plantules dans du formol à 40 o/o, puis les traiter ensuite par le bichromate. Il est facile, en opérant de cette façon, de fixer une série complète de plantules par le formol, puis de faire la recherche du tannin plus tard au moyen du bichromate. Il devient facile alors de connaître sur quelles plantules apparaît le tannin et quelles sont les lois qui président à la transformation d'un épiderme indifférencié en un épiderme sécréteur.

Règles d'apparition du tannin. — On constate que l'embryon de la graine est complètement dépourvu de tannin et que les très jeunes plantules demeurent également complètement incolores dans le bichromate. (Stade de plantule très jeune, coque de la graine non ouverte). Dès que la coque de la graine s'est ouverte sous l'effet de la poussée germinative, le tannin se montre dans les cellules épidermiques de la radicule. Dans l'hypocotyle et dans les cotylédons, l'épiderme ne brunit pas encore et l'examen microscopique des cellules n'y montre pas de précipitations brunes. Seuls les tubes sécréteurs (1) sous épidermiques se colorent et apparaissent comme de courtes

(1) Ces tubes sécréteurs ont été signalés chez les plantules de Gymnospermes par M. Chauveaud.

lignes brunes ; on constate au microscope que les tubes sont déjà assez allongés, mais qu'ils ne se colorent pas dans toute leur étendue.

Sur une plantule un peu plus âgée, les tubes sécréteurs sont plus longs. L'épiderme de la radicule se colore comme précédemment, mais en outre, la base de l'hypocotyle commence à son tour à devenir sécrétrice. Plus tard, l'hypocotyle tout entier devient tannifère, puis la base des cotylédons.

L'extrême pointe des cotylédons reste longtemps dépourvue de tannin et reste blanchâtre après l'action du bichromate jusque dans les plantules ayant 2 ou 3 cm. de longueur, c'est-à-dire à peu près tant que les cotylédons ont un rôle absorbant au contact de l'endosperme.

Lorsque les cotylédons sont proches de leur épanouissement, on peut faire quelques remarques sur la répartition du tannin dans l'épiderme : toutes les cellules épidermiques de la face externe ou des faces internes du cotylédon sont tannifères, à l'exception toutefois des cellules stomatiques qui se détachent en clair sur l'épiderme coloré en brun par le bichromate ; (1) Il y a des tubes sécréteurs sous épidermiques sur les trois faces (Essai au moyen de bichromate pendant 48 heures).

Dans l'hypocotyle, de même, le bichromate montre du tannin dans toutes les cellules sauf dans les cellules stomatiques.

Cette abondance du tannin dans l'épiderme des jeunes plantules donne toute sa valeur à nos observations relatées précédemment sur les colorations vitales. En effet, si l'on fait exception des cellules stomatiques, faciles à distinguer grâce à leur disposition spéciale, on voit que l'évolution des cellules épidermiques consiste dans la succession des étapes suivantes : 1° cellules à vacuome aleurique ; 2° cellules à vacuome filamenteux ou réticulé non tannifère ; 3° cellules à vacuome tannifère (réticulé ou non). Un quatrième stade est constitué, nous l'avons vu, par les cellules à vacuome anthocyanifère.

(1) Elles contiennent en réalité une très petite quantité de tannin, et leur coloration vitale n'est pas métachomatique.

Acide osmique 1°/₀. — Ce réactif si sensible des tannins ne peut nullement remplacer le bichromate dans la recherche du tannin des plantules, parce qu'il est réduit en même temps par les huiles qui sont très abondantes dans les jeunes plantules. Cependant, on arrive avec un peu d'habitude et sur des coupes tangentielles très minces d'épiderme, à distinguer la couleur noire du vacuome tannifère, de la teinte brunâtre prise par les globules d'huile. Cela suffit pour constater que la disposition des cellules tannifères se révèle identique par ce procédé à celle que montre le bichromate. D'ailleurs, lorsque la plantule a quelques centimètres, l'huile n'est plus gênante parce qu'elle est beaucoup moins abondante et l'acide osmique peut rendre exactement les mêmes services que le bichromate, car il fixe le vacuome dans ses détails (réseaux).

Sels de fer. — Le perchlorure de fer est un mauvais réactif microchimique des tannins, car il désorganise la cellule. Il colore bien les tubes sécréteurs en noir ou brun noir, mais donne de moins bons résultats dans les cellules épidermiques.

Acétotungstate de soude. — Le tannin des vacuoles ne se colore par ce réactif que lorsqu'il est en quantité notable, comme dans les vacuoles de la radicule. Il forme alors des masses de *couleur jaune fauve* ; dans l'hypocotyle, à l'époque où celui-ci est peu tannifère, il se précipite de petits granules qui paraissent incolores. La localisation des cellules tannifères est la même qu'avec le bichromate et l'acide osmique.

Hypochlorite de soude. — Ce réactif donne une coloration jaune citron dans les vacuoles tannifères. Dans quelques cas, la teinte prise est jaune vert très nettement. Ces colorations s'observent, bien entendu, après une action ménagée de l'hypochlorite, car si l'effet est prolongé, il se produit comme l'on sait une destruction complète du contenu cellulaire. Ce réactif est considéré comme indiquant la présence d'*acide ellagique*.

Réactif de Courtonne. — (Acétate neutre de plomb).

Après un contact de 24 heures, on constate un précipité jaune grisâtre dans les cellules tannifères de l'hypocotyle. Ce réactif donne au contraire un précipité formé de petits grains verts dans les vacuoles à anthocyane.

Les tubes sécréteurs se colorent en jaune grisâtre.

B. — Etudes des autres lignées cellulaires dans la plantule de Pin maritime.

Dans les pages précédentes, l'évolution vacuolaire a été suivie avec détail, dans un seul tissu, l'épiderme des cotylédons et de l'hypocotyle chez la plantule; il est nécessaire en effet, pour des recherches aussi délicates, de se limiter à une seule lignée cellulaire et de l'étudier complètement, car les résultats obtenus ont une importance théorique très grande qui dépasse beaucoup le simple exposé des faits : il s'agit en effet de prendre parti au sujet de questions telles que celles-ci : les vacuoles constituent-elles un système d'éléments autonomes? peuvent elles apparaître *de novo* dans un cytoplasme précédemment homogène? L'évolution de l'aleurone telle que nous venons de la décrire, prouve nettement que les vacuoles dérivent toujours d'autres vacuoles ou de corpuscules vacuolaires préexistants, et que par conséquent elles ne se forment jamais *de novo*.

Les autres tissus de l'embryon du Pin, renfermant des grains d'aleurone tout comme l'épiderme; il est déjà certain par analogie que ces grains se transforment en vacuoles pendant la germination, mais il est naturellement plus difficile de suivre leur évolution au moyen de colorations vitales, car il est nécessaire d'opérer les colorations sur des coupes. — Toutefois, il n'y a pas là une difficulté insurmontable.

Lorsque la plantule de Pin maritime est jeune, on peut facilement la séparer en deux moitiés longitudinales au moyen du rasoir. Les deux parties ainsi isolées peuvent être ensuite

colorées dans une solution de rouge neutre ou de bleu de crésyl et l'on obtient de bonnes colorations vitales dans les cellules vivantes qui se trouvent un peu au-dessous de la surface de section.

On constate de cette façon que les grains d'aleurone, au cours de leurs transformations, restent toujours colorables vitalement. Leur évolution pendant la germination consiste en une liquéfaction progressive qui aboutit au système des vacuoles de la plantule.

A ce sujet, il existe de nombreuses variantes. Dans les cellules de l'écorce et de la moelle, les grains d'aleurone sont volumineux de forme ovale et renferment un globoïde. Lorsqu'ils se transforment en vacuoles, leur substance fondamentale devient de plus en plus liquide et le volume du grain augmente. En cet état, le grain est déjà transformé en une petite vacuole et la paroi de celle-ci, facilement dépressible, se déforme sous l'effet des pressions à son contact, d'où résultent les formes un peu irrégulières ou étoilées qu'on observe à ce moment. Le globoïde, assez longtemps visible comme une inclusion incolore, finit par disparaître.

A mesure que le suc aleurique devient moins épais, il se montre plus facile à précipiter et dans les colorations vitales il est fréquent d'observer le dépôt de corpuscules variés, très colorés, qui s'appliquent sur les parois des vacuoles.

En cet état, les vacuoles aleuriques ayant perdu leurs inclusions dissoutes et possédant un suc peu épais, ne diffèrent pas sensiblement des vacuoles typiques. D'autre part, leur suc qui était assez alcalin au début, (teinte rouge brique du rouge neutre), est devenu neutre ou légèrement acide, (teinte rose du rouge neutre).

Il est assez fréquent d'observer dans les cellules de parenchyme dont nous venons de parler, (écorce et moelle), à côté des gros corps aleuriques à inclusion précédemment cités, de petits grains d'aleurone sans inclusion qui les accompagnent. Ces grains ne sont pas des néoformations, car ils existent déjà

dans la graine ; au cours de la germination, ils se comportent d'une façon un peu différente de celles des gros grains à inclusions, car ils prennent sous l'effet des pressions internes des formes allongées qu'on ne saurait mieux comparer qu'à celles développées dans l'épiderme. Ils finissent par se fusionner avec les autres vacuoles.

En dehors des parenchymes, il y a dans les autres tissus de l'embryon de Pin, des grains d'aleurone petits et sans inclusion comparables à ceux de l'épiderme ; il en est ainsi dans le méristème terminal de la radicule, dans le méristème vasculaire de l'hypocotyle et des cotylédons, enfin dans la gemmule.

Dans le méristème vasculaire, les colorations vitales sur coupes, montrent que l'évolution de l'aleurone en vacuoles a lieu avec passage intermédiaire par des formes filamenteuses et des réseaux. (*fig.* 17, *pl. II*).

Dans la gemmule une évolution analogue se produit ; comme elle est plus facile à observer, nous l'avons suivie en détail.

Gemmule. — Dans la graine mûre, la gemmule constitue une zone en forme de coussinet située entre les cotylédons. On peut colorer vitalement les cellules de cette région au moyen du rouge neutre qui met en évidence de nombreux petits grains d'aleurone arrondis, sans inclusions, répartis uniformément dans un cytoplasme épais et oléifère. Ces petits corps sont à ce moment de réaction alcaline, car ils prennent une teinte jaune orangée (*fig.* 14, *pl. II*).

Au moment de la germination, il apparaît sur le point de végétation des protubérances correspondant aux futures feuilles et qui sont disposées en plusieurs verticilles. Lorsque la plantule a une racine de un centimètre environ, les jeunes feuilles du verticille externe sont déjà individualisées et présentent une forme triangulaire ; leur longueur est encore très faible. Les cellules épidermiques ont leur vacuome formé de filaments ou de réseaux d'une finesse extrême, dont la couleur

est orangée, indiquant toujours une nature un peu alcaline de la substance dont il sont formés (*Fig.* 15, *pl. II*). Ces réseaux sont très modifiables. Il n'y a pas de doute qu'ils proviennent des grains d'aleurone présents dans les cellules embryonnaires de la gemmule, dans la graine. Ceux-ci subissent donc dans la gemmule une évolution comparable à ce qui se passe dans l'épiderme des cotylédons.

La transformation ultérieure en grandes vacuoles peut s'observer facilement sur des plantules de même âge, car déjà l'évolution des vacuoles est plus avancée dans la pointe de la jeune feuille, où les vacuoles sont assez grandes, prennent déjà une réaction acide et se colorent en brun ou en rouge.

Sur les feuilles des plantules plus âgées, les cellules à vacuome filamenteux ou réticulé sont beaucoup plus rares et elles ne s'observent plus qu'à la base ; quant aux cellules à vacuoles évoluées qu'on observe dans la plus grande partie du limbe, elles sont à divers stades de transformation. Nous avons constaté, non sans surprise, que les grosses vacuoles qui sont refoulées aux extrémités de la cellule par suite de la position centrale du noyau, restent reliées entre elles par de fins trabécules anastomosés eux-mêmes en réseau dont l'ensemble forme une sorte de corbeille autour du noyau (*fig.* 18, *pl. II*). Il y a là certainement un dispositif extrêmement favorable aux échanges : il est bien probable que ces relations de grosses vacuoles entre elles ont dû passer inaperçues dans un grand nombre de cas. En effet, si l'on ne fait pas de coloration vitale, les trabécules très fins qui sont autour du noyau ne se distinguent pas aisément : surtout, ils sont extrêmement sensibles aux modifications de la tension superficielle et ne tardent pas à se résoudre, sous les yeux de l'observateur, en un certain nombre de vacuoles à contours arrondis et de tailles diverses.

Remarquons que dans les plus jeunes feuilles primordiales, lorsque le vacuome est à l'état de réseau ténu, il est absolument invisible sans coloration ; sa coloration vitale se fait progressivement, et l'intensité de la teinte s'accroît peu à peu,

ce qui prouve bien l'authenticité indiscutable de ces éléments qui appartiennent à la cellule vivante et ne sont aucunement modifiés par l'entrée du colorant vital au début d'une observation. Lorsque le vacuome se trouve au stade de réseau assez gros, et qu'il est tannifère, il devient réfringent et il est alors visible directement dans les cellules vivantes sans aucun artifice. C'est encore là un moyen qui permet de s'assurer de la réalité des images fournies en coloration vitale, car il suffit d'un peu de bleu de crésyl introduit sous la lamelle pour colorer ces réseaux sans modification. D'ailleurs, si l'on observe fréquemment la transformation d'un réseau vacuolaire en petites vacuoles séparées, à la suite d'un examen microscopique prolongé, l'inverse n'a jamais lieu : *les réseaux vacuolaires sont donc bien un des aspects normaux du vacuome sous l'influence des phénomènes de la vie cellulaire.*

Nous avons fait l'essai de l'acide osmique sur les jeunes feuilles. La réduction a lieu au contact des vacuoles à tannin qui sont abondantes au sommet d'une jeune feuille ayant 1 millimètre de longueur. Le tannin apparaît de bonne heure, car l'acide osmique colore et fixe des réseaux parfois très fins sans altérer sensiblement leur forme. On trouve cependant à la base d'une feuille suffisamment jeune, des cellules moins différenciées qui ne réagissent pas et doivent être encore dépourvues de composés phénoliques : elles correspondent aux cellules dont le vacuome est en réseau orangé. Comme d'autre part les grains d'aleurone dont dérivent les vacuoles, n'offrent dans la graine aucune des réactions du tannin, il est certain que l'apparition de ces composés ne constitue qu'un stade de l'évolution chimique du vacuome, ce qui est conforme à ce que nous connaissons ailleurs.

Les cellules à grains d'aleurone et celles à l'intérieur desquelles, à la germination, on colore des réseaux orangés, sont des éléments qui ne montrent aucun système de vacuoles sur le vivant, sans coloration. On pourrait croire qu'il s'agit de cellules à cytoplasme plein, d'où l'intérêt que présente leur

coloration vitale. Au contraire, dès que le système renferme du tannin, il devient réfringent et l'on pourrait croire que l'on assiste alors à une néoformation des vacuoles : en réalité, il n'en est rien comme nous venons de le démontrer.

C. — **Etude de la plantule de Pin maritime après fixation et coloration.**

Il existe un excellent procédé pour mettre en évidence l'aleurone dans les diverses parties de la graine ; il consiste à employer la méthode de Regaud. Dans ces conditions, la substance fondamentale des grains d'aleurone fixe avec énergie l'hématoxyline et se colore en noir ; on peut alors caractériser dans l'embryon de Pin plusieurs sortes de grains d'aleurone, qui correspondent à ceux que nous avons distingués précédemment au moyen d'observations vitales.

Dans l'épiderme des cotylédons et de l'hypocotyle, nous avions reconnu de petits grains sans inclusions. Après fixation et coloration, ces cellules montrent les mêmes corps aleuriques teints en noir intense par l'hématoxyline. Lorsqu'on régresse suffisamment la préparation, on peut en observer qui sont décolorés partiellement et gardent seulement une couleur gris pâle. Ces grains n'ont subi du fait de la fixation aucune rétraction et ils ne sont entourés d'aucune auréole hyaline, comme ce serait le cas s'il y avait contraction de leur substance (*fig. 3 et 4, pl. XIV*).

Ils peuvent se présenter sous plusieurs états ; quelquefois ils sont colorés en totalité ; plus souvent leur protéine est précipitée sous l'action du fixateur, à l'état de petits granules libres dans le minuscule vacuole, ou bien sous forme d'un croissant coloré sur les parois, ce qui pourrait faire croire à l'existence d'un globoïde. Parfois même, la structure est telle qu'elle rappelle celle d'un grain à deux globoïdes. Les grains d'aleurone sont entourés d'une mince couche de cytoplasme ; celui-ci dessine un réseau irrégulier coloré en gris, dans les

mailles duquel se trouvaient les globules d'huile : ces derniers ayant été dissouts au cours du montage des préparations, apparaissent comme autant d'espaces clairs (1). Dans les trabécules du réseau protoplasmique se trouvent de petites granulations : les unes assez grosses, en courts bàtonnets ou en grains, correspondent aux plastes, les autres beaucoup plus petites sont très probablement des microsomes (*fig.* 1, *pl. XII*). Les plastes sont parfois producteurs d'amidon, comme on peut l'observer en faisant agir de l'eau iodée sur la préparation, ou mieux encore sur une coupe d'embryon frais.

En dehors de l'épiderme, la méthode de Regaud permet de reconnaître, qu'il existe dans d'autres régions de l'embryon, de petits grains d'aleurone de même sorte que ceux de l'épiderme et qui correspondent aux élément colorés vitalement et décrits précédemment.

Cellules de la gemmule. — Les cellules de la gemmule contiennent comme l'épiderme des grains d'aleurone sans inclusions ; après fixation et coloration au moyen de la méthode de Regaud on les met très bien en évidence (*fig.* 3. *pl. XII*). Ce sont des grains arrondis, de tailles diverses, qui fixent fortement l'hématoxyline et se teignent en noir foncé : leur nombre est élevé. Ils sont séparés les uns des autres par des espaces clairs, provenant de la dissolution de l'huile et le cytoplasme lès entoure étroitement. Ces grains d'aleurone, qui représentent ici l'appareil vacuolaire de la cellule, se colorent donc absolument comme le feraient des plastes et sans aucune rétraction (2).

En dehors des grains d'aleurone, il y a de petites granulations dont la taille se rapproche beaucoup de celle des plus petits grains d'aleurone, de sorte qu'il y a là une vraie difficulté pour distinguer ce qui correspond aux plastes et ce qui correspond aux grains d'aleurone. Cependant si l'on régresse

(1) Ces espaces clairs ne doivent pas être pris pour des vacuoles lesquelles sont inexistantes et représentées en puissance par les grains d'aleurone.

(2) Ils se colorent en totalité et leur contenu se précipite rarement.

suffisamment la préparation, les plastes et les microsomes se décolorent complètement, tandis que l'aleurone reste colorée.

Cellules des faisceaux procambiaux. — Celles qui sont au voisinage des initiales et les initiales elles-mêmes, ont un contenu épais, renfermant une grande quantité de grains d'aleurone fortement colorés en noir par l'hématoxyline. Là aussi il est très difficile de distinguer les grains d'aleurone des granulations étrangères au vacuome. On peut affirmer cependant que tous les éléments sont granuleux (*fig.* 2, *pl. XII*).

Comme exemple de cellule renfermant des grains d'aleurone à inclusions nous pouvons décrire une cellule parenchymateuse de l'hypocotyle.

Cellules de parenchyme. — Ce sont des cellules assez grosses, généralement rectangulaires sur les coupes longitudinales; elles renferment un gros noyau central assez souvent déformé. La cytoplasme forme un réseau, dont les mailles entourent les inclusions abondantes, représentées par l'aleurone et par l'huile. Comme les globules d'huile ont été dissous, il ne reste plus à leur place que des espaces clairs, qu'il ne faudrait pas confondre avec des vacuoles.

Les grains d'aleurone sont nombreux et presque tous de grande taille, leur forme est arrondie ou ovale ; ils contiennent un ou deux globoïdes incolores, tandis que la substance fondamentale est colorée par l'hématoxyline en noir ou en gris foncé suivant l'état plus ou moins régressé de la préparation. Il existe ordinairement de petits grains d'aleurone d'une taille beaucoup plus petite en compagnie des précédents ; ils peuvent être dépourvus d'inclusions et dans ce cas se colorent en totalité par l'hématoxyline (*fig.* 3, *pl. XIV*).

En dehors des enclaves du cytoplasme, il y a un système de plastes arrondis ou ovales ; ils secrètent de l'amidon dans la graine abondamment.

Cette étude de l'embryon de la graine, fixée et colorée suivant la méthode de Regaud, confirme et complète ce que

nous avions appris déjà au moyen de la méthode vitale. Elle montre entre autres résultats intéressants, que les grains d'aleurone ne sont jamais à l'intérieur de vacuoles, mais sont entourés directement par le cytoplasme ; il n'existe pas de vacuoles à proprement parler dans les tissus de l'embryon d'une graine, mais seulement un système d'éléments vacuolaires compacts, les grains d'aleurone, qui sont fixés sans aucune contraction de leur substance à l'intérieur du cytoplasme et se colorent d'une manière intense par l'hématoxyline. Ces grains lorsqu'ils sont petits et sans inclusion, (épiderme, gemmule, méristème vasculaire), peuvent être confondus avec les globules d'huile si l'on emploie un fixateur osmié (liquide de Laguesse). La méthode vitale est très utile dans ce cas pour interpréter les préparations.

La méthode de Regaud est donc très favorable à l'étude de la graine ; elle se montre au contraire en partie défectueuse lorsqu'il s'agit de suivre l'évolution de l'aleurone pendant la germination.

Germination. — Il faudrait comme précédemment suivre l'évolution de chaque lignée cellulaire. Nous n'avons pas l'intention de le faire ; il n'y a en somme que deux catégories principales de cellules assez dissemblables, celles des méristèmes (y compris l'épiderme) et celles des parenchymes.

Dans les méristèmes, l'évolution de l'aleurone est particulièrement difficile à suivre au cours de la germination ; les petits grains d'aleurone déjà peu distincts des plastes dans la graine, deviennent méconnaissables ; on ne les reconnaît guère que dès le début de la germination (*fig.* 6, *pl.* XII). Ils ont alors les mêmes caractères que ceux de la graine. Plus tard ils se transforment en filaments et en réseaux délicats comme nous le savons, mais ceux-ci ne sont pas fixés ; ils doivent être représentés par de minces canalicules incolores que l'on voit quelquefois. Ces minces boyaux doivent contenir un contenu colorable plus ou moins précipité, mais il est impossible de faire aucune

distinction dans des cellules aussi petites entre les granules vacuolaires et ceux qui représentent des plastes ou des microsomes.

D'autre part, les inclusions d'huile qui sont dissoutes laissent après elle autant d'espaces clairs que nous n'avons aucun moyen de distinguer des vraies lacunes vacuolaires.

Pour toutes ces raisons, la méthode de Regaud se montre inférieure à la méthode des colorations vitales, sans laquelle l'on ne saurait pas jusqu'à présent reconnaître l'évolution de l'aleurone si particulière des cellules méristématiques.

Dans les cellules de parenchyme la distinction des éléments au cours de la germination, quoique fort difficile, peut être faite beaucoup mieux.

Le caractère principal du cytoplasme est d'être vacuolisé, mais les vacuoles ne sont pas toutes de même nature : les unes, petites et arrondies correspondent certainement à de petits espaces occupés par de l'huile dans la cellule vivante, les autres, plus grandes, de forme irrégulière et même filamenteuse, sont des vacuoles d'origine aleurique. Il n'y a pas de distinction nette à faire, sauf lorsqu'on trouve des corpuscules colorés dans ces vacuoles : on sait alors qu'il ne s'agit pas d'une lacune d'origine oléagineuse (*fig.* 5, *pl. XII*).

Les grains d'aleurone non transformés en vacuoles et gardant leur forme et leur aspect caractéristiques, s'observent assez longtemps (plantules de 2 cm. long et plus), c'est dans les cotylédons qu'on les observe le plus longtemps. Leur protéine peut se présenter non précipitée et colorée par l'hématoxyline en noir, soit d'une façon homogène, soit sous forme d'un fin dépôt granuleux à l'intérieur de la vacuole (*fig.* 4, 7, 8, *pl. XII*).

La méthode de Regaud donne peu de renseignements sur le mode d'évolution de l'aleurone. En effet, lorsque les grains sont partiellement transformés en vacuoles, on distingue mal celles-ci des lacunes d'origine oléagineuse et il est impossible de se faire une opinion par ce procédé sur une néoformation possible de vacuoles, au cours de la germination. Cette forma-

tion *de novo,* paraît impossible à admettre après les résultats obtenus dans les préparations vitales.

A côté de l'aleurone existe le système des plastes fort net, surtout dans le parenchyme cotylédonnaire. Leur forme est normale, arrondie, ovale et souvent en massue. Ils présentent de petites vésicules claires sur leur trajet, correspondant à de l'amidon (*fig.* 7, 8, 9 18, *pl. XII*).

Les microsomes forment aussi un système très distinct.

Tubes sécréteurs. — Ces éléments ont été décrits par M. Chauveaud dans les plantules de Conifères. Ce sont des tubes allongés qui se développent d'une façon considérable dans les jeunes germinations : plus tard ils sont absents en général.

Leur étude histologique n'a pas été faite et les descriptions de M. Chauveaud ne nous apprennent pas s'il s'agit de tubes plurinucléés ou mononucléés, ni quel genre de sécrétion est contenu dans ces tubes. Il est donc nécessaire que nous donnions quelques détails à ce sujet.

Les coupes en série permettent de s'assurer que les tubes sécréteurs sont toujours unicellulaires et uninucléés. Ils sont formés par une seule cellule, qui subit un allongement très considérable, ce qui peut lui donner une longueur totale de plusieurs millimètres alors que la largeur ne dépasse pas une trentaine de μ (*fig.* 10, *pl. XII*).

Le noyau est unique, mais d'une taille très grande et il est allongé dans le sens de la longueur du tube. Il montre à sa surface plusieurs nucléoles très gros disposés en ligne.

La substance sécrétée est contenue dans deux très grandes vacuoles, remplissant une bonne partie du diamètre du tube et s'étendant dans toute sa longueur.

Par suite de la disposition des vacuoles, le cytoplasme se trouve réduit à une mince couche pariétale dans la plus grande partie de la longueur du tube et ce n'est que dans la région qui avoisine le noyau, ainsi qu'aux extrémités, que son abondance est un peu plus grande.

Cette couche pariétale est très intéressante par la distinction très nette qu'elle montre entre les éléments cytoplasmiques. Les uns sont des plastes très caractérisés, qui sont pourvus sur leur trajet d'une petite vésicule incolore. Celle-ci représente très probablement de l'amidon.

Ces plastes ont souvent une forme allongée, droite ou incurvée, ce sont alors des filaments correspondant à ce que M. P. A Dangeard appelle des *mitoplastes* (*fig.* 10, *pl. XII*).

A côté d'eux, des granulations toutes semblables et sphériques, de très petit taille représentent le *sphérome* (*sphérosomes* ou *microsomes* de M. P. A. Dangeard.)

Sécrétion des tubes. — Toujours renfermée dans les vacuoles, la sécrétion correspond à un contenu tannifère; nous avons signalé en effet plus haut, que sur les jeunes plantules les tubes sécréteurs apparaissaient de bonne heure et s'indiquaient comme des lignes brunes sous l'action du bichromate de potasse.

Il donnent également les autres réactions des tannins, (acide osmique, perchlorure de fer). Sur les coupes fixées et colorées par la méthode de Regaud, le contenu vacuolaire se présente comme un fin précipité granuleux faiblement coloré en gris (*fig.* 10, *pl. XII*).

Un des faits les plus marquants que met en évidence la méthode de Regaud appliquée à l'aleurone est le suivant : dans la graine, la substance protéique fondamentale se colore en noir foncé par l'hématoxyline; dès la germination les grains d'aleurone se transforment en vacuoles qui ne contiennent plus qu'une infime proportion de substance chromophile.

Cette matière devenant de plus en plus diluée dans le suc cellulaire, finit par ne plus être représentée que par quelques granules qui se retrouvent précipités et fortement colorés en noir à l'intérieur de la vacuole. Nous pensons que cette substance est identique à celle qui donne lieu au

phénomène des colorations vitales et nous l'assimilons à la métachromatine en raison de ces deux propriétés principales.

ART. 2. — *L'ALEURONE ET SON EVOLUTION PENDANT LA GERMINATION DE QUELQUES GYMNOSPERMES*

Nous avons coloré vitalement un certain nombre de plantules de Gymnospermes prises à des états divers de leur développement, afin d'y rechercher de quelle façon se faisait l'évolution de l'aleurone pendant la germination par comparaison avec le Pin maritime.

Partout nous avons trouvé une analogie très grande avec ce qui se passe chez le Pin.

Pour observer des grains d'aleurone, il faut colorer des plantules très jeunes dont l'enveloppe séminale est encore intacte. Plus tard, l'épiderme des plantules ne montre plus ordinairement que des réseaux vacuolaires provenant de la réunion des substances aleuriques entre elles. Enfin les plantules plus âgées ont un épiderme tannifère et même parfois anthocyanifère et ces produits sont renfermés dans des vacuoles typiques. largement dilatées.

Les expériences de coloration vitale ont portées sur les espèces suivantes :

Thuia orientalis, Cupressus sempervirens, Cedrus libani, Larix europea, Taxus baccata, Gingko biloba.

A. *THUIA ORIENTALIS.*

La germination des graines de Thuia a lieu facilement et se produit au bout de dix à quinze jours à l'étuve à 20°. Les très jeunes plantules, au stade où la coque de la graine vient d'éclater, se colorent très facilement par le rouge neutre ; après un séjour de quelques minutes dans le bain colorant, leurs cotylédons et leurs hypocotyles ont pris une teinte orangée, tandis que les cellules de la coiffe se sont colorées en rose (*Fig.* 21, *Pl. IV*). L'examen de coupes tangentielles

des cotylédons, montre des cellules épidermiques allongées, deux ou trois fois plus longues que larges et renfermant dans leur partie centrale un gros noyau. Dans le cytoplasme sont accumulées de très nombreuses gouttelettes d'huile et de petits grains d'aleurone, au nombre de vingt ou trente par cellule, qui se colorent en rouge orangé intense : le reste de la cellule reste complètement incolore. Certains grains d'aleurone n'ont déjà plus la forme sphérique qu'ils avaient dans la graine : ils commencent à se déformer et à prendre des allures filamenteuses (*fig.* 9, *pl. IV*).

Dans l'hypocotyle, l'évolution du vacuome de cette plantule est plus avancée : on ne trouve plus de cellules à très petits grains d'aleurone comme dans les cotylédons, mais un vacuome en réseau orangé ou en grosses masses vacuolaires situées à chaque extrémité de la cellule (*fig.* 10, *pl. IV*). De place en place il y a des cellules à vacuome rouge ou rosé (ces cellules sont les éléments tannifères) (*fig.* 11, *pl, IV*).

Lorsqu'on observe le vacuome dans l'épiderme à partir des cotylédons jusqu'à l'hypocotyle, les aspects de réseau deviennent de plus en plus fréquents. En un mot, il y a toutes les transitions dans une plantule de cet âge entre l'aleurone et les vacuoles plus grandes qui résultent de leur évolution.

Essai des réactifs des tannins. (Acide osmique). — Une plantule très jeune dont la racine commence à se montrer au dehors, est placée dans l'acide osmique à 1 o/o : elle noircit très vite à cause des globules d'huile juxtaposés, très nombreux dans toutes les cellules. Dans les cotylédons une coupe tangentielle permet de voir des globules d'huile juxtaposés, des intervalles incolores (cytoplasme) et quelques globules incolores clairs (aleurone). A la base de l'hypocotyle, il y a au contraire du tannin dans certaines cellules, on le reconnaît à un précipité de petits grains noirs dans les vacuoles ; ce sont les cellules qui prennent une teinte rose en coloration vitale comme nous l'avons vu précédemment.

Le bichromate de K à 3 o/o donne un précipité brun dans les cellules à tannin. Le chlorure ferrique donne un précipité noir dans ces mêmes cellules.

Les plantules de Thuia élaborent donc du tannin dans les mêmes conditions que celles du Pin maritime. Ce tannin paraît être de même nature.

B. *CUPRESSUS SEMPERVIRENS.*

Lorsque la graine commence à germer (éclatement de la coque), la plantule peut être extraite facilement de l'endosperme au sein duquel elle est plongée. Elle consiste en un petit axe terminé d'un côté par deux cotylédons aplatis et de l'autre par une extrémité arrondie revêtue par les cellules de la coiffe.

La plantule étant placée dans une solution de colorant vital, on constate une pénétration rapide dans les cellules de la coiffe, qui prend une teinte rosée (s'il s'agit du rouge neutre). (*fig.* 20, *pl. IV*).

L'hypocotyle et les cotylédons prennent au contraire une teinte orangée pâle. Enfin lorsque le contact avec le colorant a été prolongé, on remarque des lignes colorées, allongées parallèlement à la longueur du cotylédon et qui correspondent aux vacuoles tannifères des tubes sécréteurs (tubes sécréteurs de M. Chauveaud), qui sont situés sous l'épiderme (*fig.* 19, *pl. IV*).

L'épiderme des cotylédons coloré vitalement, montre de petits grains d'aleurone arrondis n'ayant pas subi encore de notables changements ; ils ont pris une teinte orangée avec le rouge neutre ; dans d'autres cellules cotylédonnaires dont l'évolution vacuolaire est plus avancée, on trouve des filaments contournés ayant cependant conservé leur individualité (*fig.* 8, *pl. VIII*).

Sur une plantule plus âgée dont la radicule a 1/2 centimètre de long, les grains d'aleurone à la pointe du cotylédon, sont

réunis en un réseau vacuolaire qui prend une couleur orangée ou rouge brique avec le rouge neutre (*fig.* 8, *pl. IV*). A la base, l'évolution est plus avancée et les réseaux vacuolaires plus gros et à contenu fluide, précipitent à leur intérieur de gros granules bruns.

Dans l'hypocotyle, le vacuome est encore plus évolué et ne se colore plus métachromatiquement, la coloration prise avec le rouge neutre est rosée et il y a de gros granules rouge brique précipités dans la vacuole (*fig.* 6, *pl. IV*).

Chez le Cupressus sempervirens, l'évolution de l'aleurone conduit donc à des vacuoles normales tannifères avec passage intermédiaire par des formes réticulées. Les transformations ont beaucoup d'analogie par conséquent avec celles qui ont été observées précédemment chez le Pin et chez le Thuia.

Essai des réactions des tannins. — Nous avons plongé des plantules très jeunes dans les principaux réactifs des tannins : (acide osmique à 1 o/o, perchlorure de fer à 3 o/o, bichromate de K à 3 o/o, acétotungstate de Na).

Tous ces réactifs ont donné des résultats positifs dans les cellules épidermiques de l'hypocotyle et des cotylédons. Nous avons constaté que le tannin n'existe pas dans l'hypocotyle et dans les cotylédons d'une plantule très jeune (début de la germination), mais qu'ensuite il envahit tout l'épiderme.

Des tubes sécréteurs sous-épidermiques se montrent sur des plantules très jeunes et donnent toutes les réactions des tannins énumérées plus haut.

C. *CEDRUS LIBANI.*

Nous avons commencé l'observation du système vacuolaire sur des graines non germées ayant néanmoins séjourné en terre pendant quinze jours : l'embryon était gonflé, en bon état, mais n'avait pas encore brisé l'enveloppe de la graine.

La coloration vitale s'est effectuée rapidement dans le rouge neutre ; une ou deux minutes suffisent pour que l'épiderme

tout entier soit coloré ; en outre les tubes sécréteurs sous épidermiques apparaissent comme des lignes rouges et il est facile de noter leur position et leur longueur. Ceux du cotylédon peuvent atteindre en dimension, la moitié du cotylédon et parfois même ils s'étendent sur sa longueur totale ; ceux de l'hypocotyle sont moins nombreux et moins longs.

A ce stade très jeune, le vacuome est représenté dans tout l'épiderme du cotylédon par des grains d'aleurone isolés de réaction alcaline (*fig.* 1, *pl. IV*) ; on observe seulement quelques rares réseaux vacuolaires acides ; dans l'hypocotyle il y a beaucoup de réseaux rouges (qui précipitent d'ailleurs rapidement) et quelques rares vacuoles orangées.

Dans d'autres graines dont la coque est intacte, mais qui sont plus évoluées, l'hypocotyle est entièrement sécréteur comme le montre la coloration rouge prise par le rouge neutre. Seules les cellules mères de stomates conservent un vacuome jaune paille, donc alcalin. Cette différence de réaction entre les cellules ordinaires d'épiderme et les cellules stomatiques est très nette. L'exemple de cette plantule nous montre que le *tannin apparaît avant l'ouverture de la coque de la graine.*

Dans les plantules plus âgées, la base du cotylédon s'imprègne de tannin à son tour et l'on ne trouve plus de grains d'aleurone isolés, même à la pointe du cotylédon où ils sont remplacés par des réseaux vacuolaires orangés de formes très variées (*fig.* 3 *et* 5, *pl. IV*) ; les réseaux dépourvus de tannin persistent à la pointe du cotylédon sur des plantules âgées, ayant une racine de plusieurs centimètres et il est posque ce fait soit en relation avec l'absorption de l'endosperme qui continue à s'opérer au moyen des cotylédons. On pourait aussi croire que l'absence de tannin est due à la privation d'oxygène, dans la pointe des cotylédons encore complètement entourée par l'endosperme et les enveloppes de la graine, mais nous avons vu que l'apparition du tannin peut se faire avant

l'ouverture de la coque, ce qui exclut cette hypothèse.

Quant aux vacuoles tannifères, elles confluent bientôt en grandes vacuoles uniques par cellule, qui se colorent très fortement en rose par le rouge neutre.

Essai des réactions des tannins. — Le tannin qui se développe dans l'épiderme des plantules et qui est produit abondamment à l'intérieur des tubes sécréteurs, présente les réactions ordinaires avec l'acide osmique, le bichromate et les sels de fer.

Déjà à l'intérieur de la graine, la plantule renferme un système de tubes sécréteurs très développé, ainsi que l'a montré Chauveaud ; ces tubes sont déjà riches en tannin et peuvent être mis en évidence facilement par les réactifs indiqués précédemment. Si l'on place en effet une plantule de Cèdre, provenant d'une graine en repos, dans une solution de perchlorure de fer à 4 o/o, on ne tarde pas à voir se colorer les tubes sécréteurs sous épidermiques en noir et apparaître ainsi comme de fines lignes noires, dont la longueur peut atteindre la moitié de celle des cotylédons. Le bichromate et l'acide osmique les colorent également.

D. *LARIX EUROPEA*.

Chez le Larix la transformation des grains d'aleurone est particulièrement rapide au moment de la germination.

Les plus jeunes plantules examinées, proviennent de graines qui ont été mises en terre à l'étuve à 20° pendant quinze jours et dont la coque n'est pas encore ouverte.

L'embryon extrait de son endosperme n'a que trois ou quatre millimètres de longueur et il est encore complètement incolore. Placé dans une solution de rouge neutre au moment où il est recueilli, il se colore bientôt sur toute une surface en quelques minutes, l'épiderme se teint en orangé.

L'observation microscopique montre, qu'il y a dans l'épiderme hypocotylaire des granules et des filaments plus ou

moins anastomosés, dont la forme est variable. C'est le vacuome qui se colore en rouge orangé par le rouge neutre.

Dans les cotylédons il existe encore à ce stade des grains d'aleurone qui sont arrondis, peu nombreux et n'ont pas encore subi d'altération (*fig.* 14, *pl. IV*). Nous savons déjà que c'est dans les cotylédons que les grains d'aleurone conservent le plus longtemps leurs caractères, tandis que leur évolution en vacuole se fait rapidement dans l'hypocotyle. Ce phénomène paraît général.

Sur des plantules plus âgées, les grains d'aleurone ne sont plus distincts et le vacuome se trouve, à l'état réticulé dans la plus grande partie de l'épiderme (*fig.* 15 *et* 16, *pl. IV*). En outre le tannin apparaît dans l'hypocotyle, puis ensuite dans les cotylédons, suivant ainsi un ordre d'apparition ascendant.

Lorsque la plantule montre sa racine au dehors, les réseaux vacuolaires des cotylédons prennent encore une teinte orangée et ne réduisent pas l'acide osmique ; dans l'hypocotyle à ce stade, le vacuome contient au contraire du tannin réducteur et se précipite facilement par l'action du colorant vital, sous forme de granulations rouges.

Plus tard, les cotylédons eux-mêmes deviennent tannifères et leur vacuome prend une teinte rose ; la forme du réseau vacuolaire très changeante, puisqu'on la voit se modifier pendant la durée de l'observation, est surtout caractérisée par la présence de trabécules allongés et sinueux disposés autour du noyau (*fig.* 15 *et* 16, *pl. IV*) ; lorsque ce réseau se transforme en vacuoles ordinaires, ce sont d'abord les extrémités qui s'épaississent, tout en restant reliées entre elles, pendant un certain temps, au moyen des trabécules périnucléaires ; puis ceux-ci disparaissent et le vacuome est transformé en vacuoles typiques.

Réaction des tannins observés chez le Larix europea. — Dans les très jeunes germinations dont la radicule n'atteint encore que quelques millimètres de long, il est facile de constater la

présence de tannin dans l'épiderme de l'hypocotyle et des cotylédons, soit au moyen d'acide osmique, soit par l'action du bichromate.

D'autre part, le système des tubes sécréteurs est déjà extrêmement développé dans l'assise sous épidermique et se voit comme un ensemble de lignes noires, lorsqu'on a placé la plantule pendant quelques minutes dans une solution d'acide osmique. Ce système est tout aussi bien mis en évidence après action du bichromate à 3 o/o ou du perchlorure de fer à 4 o/o.

Ces réactifs montrent, que le contenu des tubes sécréteurs est constitué par un tannin, qui existe en abondance dans les grandes vacuoles s'étendant sur la plus grande partie de la longueur de ces éléments.

E. *TAXUS* BACCATA :

Les graines de l'If germent avec une certaine difficulté et demandent ordinairement deux ans pour lever. Des graines d'If de l'année ont été placées en terre à l'étuve à 20° le 21 janvier 1922 et humectées d'eau de temps en temps. Le 2 mars, une des graines est ouverte et l'embryon extrait de l'endosperme : on constate que l'embryon s'est accru et qu'il a presque doublé de longueur par rapport aux dimensions normales qui existent dans la graine mûre. Placé tout entier dans le rouge neutre, il absorbe le colorant par toute sa surface et prend rapidement une teinte orangée. Cette teinte est due à la coloration vitale des grains d'aleurone dans toutes les cellules épidermiques. Si, en effet, on prélève une portion de la surface de l'embryon au moyen d'une coupe tangentielle, (ce qui nécessite un bon rasoir et présente une certaine difficulté, étant donné la petitesse de l'embryon), on constate que les cellules épidermiques contiennent un nombre assez élevé (20 à 30), de grains d'aleurone admirablement colorés en orangé, au milieu d'un cytoplasme bourré de très petits globules d'huile; les grains sont ordinairement colorés en totalité, mais on en

trouve également qui renferment des inclusions (*fig.* 18, *pl. IV*).

Il n'existe aucune forme de vacuome en réseau et aucune déformation des grains d'aleurone ne s'est encore produite ; à plus forte raison on observe encore aucune anastomose entre eux. On peut en déduire que l'énergie du métabolisme est encore très faible et qu'aucun mouvement de brassage ne se manifeste encore dans ces graines. L'huile se trouve à l'état d'émulsion extrêmement fine.

De jeunes plantules d'If ont été examinées plus tard, alors que les graines dont elles provenaient avaient fait un séjour d'un an en terre. Les graines n'ont pas été maintenues à l'étuve ; mais placées au bout de deux mois à la température du laboratoire.

La germination n'a pas encore commencé, mais les plantules ont acquis un développement notable à l'intérieur des graines dont la coque est encore intacte. Leur longueur atteint maintenant quatre ou cinq millimètres, c'est-à-dire à peu près le double des dimensions qui s'observent dans la graine.

La plantule, placée dans une solution de rouge neutre, au dix millième, se colore bientôt sur toute sa surface en rouge orangé. On constate, en prélevant un lambeau d'épiderme, que les cellules épidermiques sont courtes, aussi longues que larges et que leur vacuome n'est plus formé de grains d'aleurone, mais de masses vacuolaires arrondies, plus ou moins volumineuses et de réseaux à gros éléments. Tout indique que la substance de ces vacuoles possède une consistance épaisse demi-fluide. Le reste du cytoplasme est parsemé de petites gouttelettes d'huile qui réduisent l'acide osmique.

On n'observe pas de tannin dans l'épiderme et le rouge neutre se colore en rouge orangé à l'intérieur du vacuome.

Des tubes sécréteurs tannifères à divers états de développement existent à ce moment dans la plantule, on les trouve

soit sous l'épiderme, soit dans le cylindre central (1). Ce sont des cellules allongées, renfermant un noyau vers le milieu de leur longueur et deux grandes *vacuoles tannifères* qui s'étendent jusqu'aux extrémités du tube. Ces vacuoles réduisent l'acide osmique.

F. *GINGKO* BILOBA.

Les graines étudiées nous ont été fournies par la maison Vilmorin. Elles sont livrées avec la mention « graines stratifiées à semer de suite ». Si on les place en terre à l'étuve à une température de 20°, elles lèvent rapidement en quinze jours ou trois semaines.

Les graines, avant germination, renferment des embryons assez volumineux, généralement dicotylés. Si on les extrait de leur endosperme et qu'on les place dans une solution de rouge neutre, on constate une absorption assez rapide par les surfaces épidermiques.

En observant au microscope, il est facile de voir que le vacuome n'est pas sous forme de grains d'aleurone, mais qu'il existe un réseau vacuolaire, ou bien des sphérules du vacuome colorées en rouge orangé par le rouge neutre, (*fig.* 17, *pl. IV*).

Ces réseaux vacuolaires s'observent encore sans changements importants durant la période germinative.

Comme nous n'avons pas examiné d'autres graines que celles qui nous ont été fournies préalablement stratifiées, nous ne pouvons pas dire s'il existe des grains d'aleurone dans l'embryon à un moment donné.

Il est possible que la graine de Gingko ne présente jamais une période de vie ralentie suffisamment caractérisée pour que le vacuome s'y établisse sous la forme de grains d'aleurone.

(1) Ces tubes n'existent dans la graine que sous forme d'ébauches peu allongées, non tannifères.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE PREMIER

Chez tous les Gymnospermes étudiés, les grains d'aleurone subissent une transformation en un système vacuolaire. On n'observe jamais la naissance *de novo* de vacuoles au cours de la germination, mais toutes les parties du vacuome dérivent directement des grains d'aleurone présents dans la graine.

Dans les jeunes plantules, les plus petits grains d'aleurone qui sont dépourvus d'inclusions et que l'on trouve dans les épidermes, la gemmule et le méristème vasculaire, prennent des formes filamenteuses et s'unissent en réseaux avant de se transformer en un vacuome normal largement dilaté. Ces formes doivent être comparées à celles que M. P. A. Dangeard a découvertes dans les méristèmes des Phanérogames, et que nous avons retrouvées dans les bourgeons des Gymnospermes. Elles correspondent à un état généralement visqueux de la substance vacuolaire.

Chez toutes les plantules étudiées, il apparaît du tannin dans l'épiderme au cours de la germination (1) ; cette substance se montre dès le début de son élaboration à l'intérieur du vacuome et on ne la trouve jamais ailleurs. La production du tannin a toujours lieu au début, d'une part dans les cellules de la coiffe, d'autre part dans l'épiderme de la radicule et de l'hypocotyle, d'où elle progresse de proche en proche sur les plantules de plus en plus âgées, jusqu'au sommet du cotylédon.

Chez *Pinus maritima, Cedrus libani, Cupressus sempervirens*, de l'anthocyane succède aux tannins dans le vacuome de l'hypocotyle, comme si le pigment dérivait directement d'une transformation des composés tanniques.

Les tubes sécréteurs décrits par M. Chauveaud dans les plantules des Conifères, sont des cellules tannifères extrêmement allongées, ainsi que le montrent nos observations. Chez le Cèdre du Liban, ces tubes contiennent déjà dans la graine un composé tannique très abondant.

(1) Sauf chez l'If et chez le Gingko dont les plantules âgées n'ont pas d'ailleurs été examinées dans ce but.

CHAPITRE II

Aleurone du Ricin.

Indications historiques.

Les grains d'aleurone du Ricin sont des corpuscules protéiques très abondants dans l'albumen des graines. Leur grosseur relative, leur structure particulière, font qu'ils constituent des objets de choix pour l'étude de l'aleurone. Leur structure a été indiquée par Pfeffer en 1872. Chaque grain dont la taille peut atteindre une dizaine de μ, est formé par une substance fondamentale, (Pfeffer l'appelle Hüllmasse. c'est-à-dire masse d'enveloppe) et des inclusions de deux sortes (cristalloïdes et globoïdes). Pfeffer a montré que les cristalloïdes, malgré leur apparence cristalline, étaient formés par une matière protéique, tandis que les globoïdes renfermaient une matière minérale, un glycérophosphate de chaux et de magnésie.

Pfeffer s'est occupé aussi de l'origine des grains d'aleurone au moment de la maturation de la graine et de leurs transformations au cours de la germination. D'après lui, il se forme d'abord des cristalloïdes et des globoïdes isolés qui apparaissent en même temps que des gouttelettes d'huile et de petits grains d'amidon dans le suc cellulaire (1). Puis un cristalloïde et un globoïde viennent au contact et adhèrent l'un à l'autre; ce n'est qu'au moment où ces corps ont atteint leur taille définitive, que l'on voit apparaître la substance fonda-

(1) Le suc cellulaire (Zellsaft) dont parle Pfeffer ne semble pas correspondre dans l'esprit de l'auteur au suc vacuolaire.

mentale, (Hüllmasse), mais cet achèvement ne se fait qu'après le déssèchement de la graine.

Pour lui, les observations de Maschke et de Gris qui pensent que les cristalloïdes et les globoïdes naissent à l'intérieur des vacuoles, sont erronées et proviennent de ce que ces auteurs ont examiné des cellules désorganisées.

La technique employée par Pfeffer, consiste dans la fixation à l'alcool pour l'étude des caractères chimiques des cristalloïdes et des globoïdes. Pour voir l'apparition et la formation des inclusions, il observe les cellules dans leur propre suc (in eigenem Zellsaft), et indique la nécessité d'opérer vite, car il se produit rapidement une désorganisation des éléments.

Wakker (1888), donne des figures de l'évolution des grains d'aleurone du Ricin pendant la maturation. Il voit qu'il existe au début de grandes vacuoles qui se fragmentent plus tard en vésicules, dans lesquelles apparaissent les cristalloïdes. Sa conclusion est que les grains d'aleurone sont des vacuoles remplies d'albumines concretées.

Werminski (1888), arrive à une opinion analogue : les grains d'aleurone ne sont pas autre chose que le produit du dessèchement de certaines vacuoles et les inclusions résultent d'une sorte de cristallisation produite dans le suc cellulaire concentré. A la germination, les grains d'aleurone se dissolvent et se transforment en vacuoles.

M. Posternack (1905) arrive à séparer les grains d'aleurone de l'huile et des membranes et il obtient ainsi une poudre dont il fait l'analyse. Il constate la présence de tous les corps simples fondamentaux. L'aleurone n'est donc pas simplement une réserve azotée.

M. Beauverie (1908), a tenté de réaliser quelques colorations vitales des grains d'aleurone du Ricin au moyen du rouge neutre. Il ne semble pas y être parvenu véritablement : on constate dit-il, sur des préparations écrasées, que les globoïdes restent incolores tandis que la substance amorphe et le cristalloïde se colorent.

Il a suivi la formation et l'évolution des grains d'aleurone sur des coupes fixées et colorées. Il est conduit à rapprocher la substance azotée des globoïdes des corpuscules métachromatiques des Protistes, principalement en raison de la coloration métachromatique prise par ces corps après coloration au bleu polychrome de Unna.

M. Mottier (1921), employant les méthodes de fixation et de coloration mitochondriales, croit pouvoir affirmer que les cristalloïdes chez le Ricin, proviennent de primordia existant dans les cellules d'albumen très jeunes et qu'il assimile à des *chondriosomes* : les cristalloïdes du Ricin auraient donc une origine mitochondriale.

Peu de temps après, nous montrons (1921), au moyen de colorations vitales, quels sont les stades de l'évolution des vacuoles aleuriques pendant la maturation et pendant la germination. Ces observations rattachent les transformations de l'aleurone à des phénomènes de même genre, décrits auparavant par nous chez le Pin maritime et à l'évolution générale du vacuome décrite par M. P. A. Dangeard.

Il est démontré que le chondriome ne participe pas à la formation des cristalloïdes comme le veut Mottier.

M. Guilliermond, peu de temps après, annonce l'indépendance du chondriome et des grains d'aleurone, ce qui confirme notre opinion.

Cet exposé montre que l'aleurone du Ricin a été très étudié. Cependant la plupart des travaux sont anciens et sont très imprécis en ce qui concerne l'évolution de l'aleurone (Pfeffer, Wakker, Werminski). Parmi les plus récents, certains sont d'interprétation erronée (M. Mottier), d'autres incomplets (MM. Beauverie, Guilliermond).

Nos résultats, obtenus par un emploi méthodique des colorations vitales, permettent de se faire maintenant une idée plus exacte et plus complète de l'origine des grains d'aleurone, de leur nature et de leur évolution, dans ses rapports avec le vacuome de la cellule. Ces résultats ont d'ailleurs été vérifiés

et confirmés par l'examen de nombreuses coupes en série, après fixation et coloration.

ART. 1er. — FORMATION DE L'ALEUBONE DU RICIN PENDANT LA MATURATION.

Nous nous sommes occupés d'abord, de l'origine des grains d'aleurone de l'albumen, puis de leur transformation pendant la germination. C'est donc toute la série des états par lesquels passe l'aleurone que nous avons observée au moyen d'une méthode nouvelle.

Le colorant vital qui convient le mieux dans l'étude de l'aleurone est le rouge neutre et après lui vient le bleu de crésyl : nous avons donc employé ces deux colorants presque exclusivement.

En examinant une graine de Ricin, on est amené à distinguer deux catégories de cellules dans l'albumen : les cellules périphériques et les cellules profondes. Ces dernières seules renferment les inclusions caractéristiques des grains d'aleurone bien connues depuis Pfeffer (cristaloïdes et globoïdes) ; les cellules de la périphérie ont au contraire des grains d'aleurone homogènes. Entre ces deux cas extrêmes, on observe tous les états intermédiaires, dans les cellules d'albumen qui se trouvent les plus proches de la couche externe. Ces différences de structure des grains d'aleurone ne paraissent pas avoir été signalées jusqu'à présent.

A. *Indications sur le mode de développement de l'albumen du Ricin.* — C'est pendant le mois d'octobre, à Paris, que l'on peut observer des fruits et des graines du Ricin assez développés pour permettre l'étude de l'albumen et des grains d'aleurone.

Les premiers stades examinés correspondaient à des fruits déjà assez gros : dans chacune des loges de ceux-ci, la graine est encore dépourvue de coque résistante et une grande partie de l'amande est occupée par les téguments de l'ovule.

Lorsque l'albumen commence à se différencier, il forme d'abord une sorte de sac dont les parois sont hyalines et composées d'un petit nombre d'assises cellulaires. Ce sac est plus vite constitué dans la région occupée par le jeune embryon, que dans l'extrémité opposée, où la paroi du sac d'albumen ne prend qu'assez tard de la fermeté. La zone interne de l'albumen, c'est-à-dire l'intérieur du sac, est vide de cellules et ne sera comblé que très tard lorsque l'embryon se sera accru et aura développé ses deux grands cotylédons dans cette région médiane : c'est alors seulement que les dernières assises de l'albumen se constituent au contact intime des surfaces cotylédonnaires.

Auparavant, la zone interne de l'albumen sera absorbée par les cotylédons pendant leur accroissement. Cette zone est hyaline ; elle montre des alignements de cellules qui indiquent que des cloisonnements se produisent qui ont pour résultat d'accroître la masse de l'albumen vers l'intérieur.

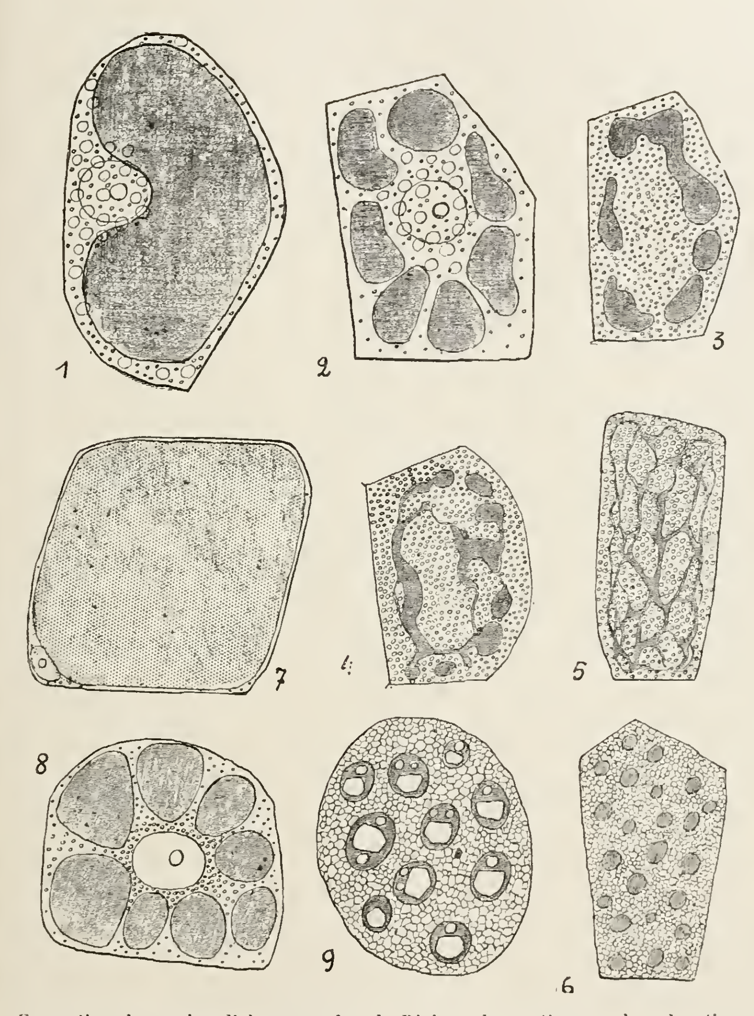
Cette zone se trouve peu à peu digérée dans sa partie la plus interne par l'embryon, dont les cotylédons prennent un grand accroissement très rapidement. C'est ainsi que lorsque ceux-ci n'ont encore que la moitié de leur longueur définitive, la zone hyaline est nettement plus épaisse dans la région qu'ils n'atteignent pas (*fig.* 15, *pl. V*).

La croissance de l'albumen de Ricin se fait donc normalement de la périphérie vers le centre, de sorte que les couches internes de l'albumen sont les dernières formées.

Ces grands traits du développement de l'albumen sont utiles à rappeler, avant d'aborder l'étude de la différenciation cellulaire.

En effet, de même que l'albumen s'accroît par des divisions successives de ses cellules vers l'intérieur, de même la transformation du vacuome en grains d'aleurone, se produit d'abord dans les couches périphériques et s'effectue en dernier lieu dans la partie profonde.

B. *Technique.* — La technique employée est celle des colo-



Formation des grains d'aleurone chez le Ricin ; observations après coloration vitale ; les vacuoles sont métachromatiques.

Fig. 1, 2, 3, 4, 5, 6, cellules de la couche externe de l'albumen. — Fig. 7, 8, 9, cellules du parenchyme de l'albumen : 1, cellule à grosse vacuole unique (on voit le début de la formation de l'huile) ; 2, vacuole fragmentée (l'huile est plus abondante) ; 3, cellule dont les vacuoles ont un contenu épais de nature colloïdale (l'huile est abondante) ; 4 et 5, cellules dont les vacuoles ont acquis une consistance semi-fluide et se sont anastomosées en réseaux (le cytoplasme est très riche en gouttelettes d'huile) ; 6, grains d'aleurone formés dans une graine un peu avant sa maturité ; 7, cellule à grosse vacuole très aqueuse ; 9, cellule d'albumen mûr montrant des grains d'aleurone et de l'huile ; 8, état intermédiaire.

rations vitales. Sa réussite est nouvelle en ce qui concerne l'albumen du Ricin, car M. Beauverie n'a pas fait de véritables colorations de cellules vivantes. On sait que l'abondance de l'huile qui accompagne l'aleurone dans les cellules d'albumen est un obstacle très gênant pour l'observation vitale. Celle-ci est considérée ordinairement comme impossible dans la graine mûre pour cette raison.

A cause de ces difficultés, et afin de répondre aux objections possibles concernant la valeur des figures observées, nous insisterons sur la méthode et discuterons les résultats au cours de l'exposé pour chaque cas particulier.

C. *Observations vitales des cellules jeunes d'albumen.* — Dès que l'albumen présente une consistance qui permet sa séparation et son isolement, on peut faire l'observation vitale de ses cellules, après coloration du vacuome dans une solution de rouge neutre ou de bleu de crésyl (1). Il n'existe alors, dans ces jeunes stades, que de grandes cellules à vacuoles typiques énormes, généralement uniques, et remplissant la plus grande partie de la cavité cellulaire. Le noyau est nettement visible, situé contre la paroi ; sa forme est arrondie et il possède un nucléole. Le cytoplasme renferme d'assez nombreux granules dont les plus gros sont placés autour du noyau : leur nature exacte ne peut être donnée par le simple examen vital (*fig.* 1, *pl.* V).

La coloration réussit bien avec le rouge neutre ou le bleu de crésyl : la grande vacuole se colore seule et la teinte prise est métachromatique, orangée avec le rouge neutre, violette avec le bleu de crésyl, ce qui indique une réaction alcaline du suc vacuolaire. Ce liquide est d'abord très aqueux (*fig.* 1, *pl. IV*), mais il s'épaissit assez vite par la suite.

Dans ces jeunes albumens, il y a déjà une différence notable entre les cellules périphériques et les cellules profondes. Le vacuome de ces dernières est constitué par une vacuole énorme :

(1) La coloration et l'observation vitale ne présentent aucune difficulté spéciale dans un tissu qui est encore très aqueux.

le cytoplasme ne forme qu'une mince couche pariétale et ne renferme que quelques rares granules. Le noyau se trouve logé dans une dépression de la vacuole et en partie dissimulé par elle. La taille des cellules profondes est beaucoup plus grande que celle des cellules périphériques elle atteint presque le double en diamètre dans l'albumen jeune (*fig.* 9, *pl. V*).

Malgré ces dissemblances, le point de départ de l'évolution vacuolaire est le même pour toutes les cellules de l'albumen : c'est l'état de grande vacuole aqueuse ; dans les albumens plus âgés, au contraire, les différences qui se manifestent, vont nous obliger pour la commodité de l'exposition à noter séparément l'évolution dans les cellules périphériques et dans les cellules profondes.

D. *Evolution dans les cellules phériphériques.* — La série des transformations de l'appareil vacuolaire s'observe facilement au début sur l'albumen examiné à plat sur la lamelle ; plus tard, lorsqu'il s'est épaissi et qu'il est devenu opaque, sur des coupes tangentielles très minces qu'on observe de la même façon.

Le rouge neutre et le bleu de crésyl peuvent être employés indifféremment : les résultats obtenus sont équivalents. Il est toujours nécessaire d'opérer les colorations sur les albumens entiers avant de pratiquer les coupes ; l'albumen absorbe le colorant avec une grande facilité par toute sa surface extérieure (1) et lorsqu'on juge à l'œil que la teinte est suffisante, on pratique une coupe mince avec un bon rasoir et on observe immédiatement dans l'eau. Un excellent éclairage de la préparation est absolument nécessaire pour l'examen aux forts grossissements. Si l'on réalise ces conditions, la préparation se lit aussi bien que la meilleure coupe, colorée après fixation.

Le morcellement des grandes vacuoles primitives se fait de bonne heure et débute à la base de l'albumen, au stade où l'on

(1) Il est toujours nécessaire de mettre à nu une partie aussi grande que possible de la surface de l'albumen, sans l'endommager ; on y arrive assez facilement en enlevant avec des pinces le tégument séminal.

commence à pouvoir séparer du nucelle cette région qui a acquis une fermeté suffisante.

Ce morcellement s'accompagne d'une production d'huile qui apparaît sous forme de nombreuses petites gouttelettes dans le cytoplasme, autour du noyau et dans les travées qui délimitent les vacuoles (*fig.* 2 *à* 4, *pl. V*).

Enfin, il se produit une accumulation de substances protéïques à l'intérieur du vacuome qui entraîne une aptitude de plus en plus marquée à fixer les colorants. La teinte prise, de plus en plus foncée, est toujours d'un beau violet avec le bleu de crésyl, rouge brique avec le rouge neutre, par conséquent toujours métachromatique.

Lorsque la coque de la graine devient noire, tout en gardant encore sa fragilité, on commence à pouvoir isoler l'albumen dans son entier. C'est le stade qui montre le plus grand nombre de phases d'évolution cellulaire, car la différenciation ne se produit pas en même temps partout et toute la gamme des états vacuolaires se rencontre sur un même albumen. Il existe encore quelques cellules à grandes vacuoles uniques, des stades divers de fragmentation, des réseaux, des petites vacuoles nombreuses et isolées. L'huile s'est amassée en si grande quantité que le noyau est ordinairement invisible ; en même temps, l'abondance des albuminoïdes, donne aux vacuoles une consistance demi-fluide qui est attestée par les variations de forme auxquelles on assiste (*fig.* 5 *à* 7, *pl. V*).

Ces changements montrent qu'il s'agit bien de cellules vivantes et que les formes observées ne sont pas artificielles.

A une période plus avancée de la maturation, les formes en réseau du vacuome deviennent très nombreuses. Pour les observer, il faut choisir l'albumen d'une graine à coque noire et déjà un peu dure. Sur une graine plus âgée, à coque noire et dure et à la base de l'albumen, les grains d'aleurone sont déjà isolés et constitués avec l'aspect qu'ils auront dans la graine complètement mûre. Dans la partie moyenne de l'albumen au contraire, il existe encore des réseaux très variables

de formes. Ceci montre que l'assise périphérique de l'albumen se différencie dans la direction micropylaire, (région où se développe la caroncule).

Les formes réticulées du vacuome sont extrêmement remarquables : on les trouve dans les cellules périphériques d'albumen pendant la période où la cellule est bourrée de petits globules d'huile qui constituent une très fine émulsion dans le cytoplasme (*fig.* 5 *et* 6, *pl.* V). Malgré cette accumulation, il existe encore un certain mouvement de brassage dans la cellule, ce qui occasionne des modifications très régulières dans la forme du réseau. Au contraire, lorsque ce dernier s'est résolu en petites vacuoles arrondies, dont chacune a la valeur d'un grain d'aleurone, il ne se manifeste plus aucun mouvement d'ensemble : les globules d'huile apparaissent comme juxtaposés délimitant un réseau occupé par le cytoplasme. La cellule va entrer dans une phase de repos (*fig.* 8, *pl.* V).

Les réseaux correspondent, on le voit, à la période qui précède la maturation, alors que se produit un dessèchement progressif de la future graine ; ils correspondent aussi à une phase de mouvements cytoplasmiques intenses. Ils sont bien réels, car ils peuvent se voir, difficilement il est vrai, sans coloration vitale, comme des diverticules clairs, parce que le vacuome à ce stade est légèrement réfringent. C'est une vérification que l'on fait ainsi d'un phénomène constaté d'une manière tout à fait générale, la conservation parfaitement fidèle du vacuome par les colorations vitales.

L'évolution du vacuome chez le Ricin, pendant la maturation de l'albumen, consiste donc dans le morcellement d'une grande vacuole primitive, dont les éléments finissent par s'isoler sous forme de grains d'aleurone. Un stade réticulé du vacuome précède la transformation en grains. Cette évolution s'accompagne d'une augmentation du cytoplasme et du dépôt d'huile en quantité considérable à son intérieur.

E. *Evolution dans les cellules profondes.* — Ces cellules comme les précédentes, renferment chacune au début une grande

vacuole typique gorgée d'eau (*fig.* 9, *pl.* V) : l'ensemble du tissu est hyalin. La différenciation débute au contact de la couche cellulaire externe, où le tissu de l'albumen prend bientôt une couleur blanche opaque et elle gagne à partir de là de plus en plus en profondeur. Sur une graine à coque noirâtre, mais qui n'est pas encore dure, il y a deux zones très nettes dans l'albumen, une tranche extérieure blanchâtre, opaque et une mince tranche interne hyaline (*fig.* 19, *pl.* V). La première correspond à des éléments déjà riches en huile et qui renferment des vacuoles aleuriques presque achevées, la deuxième est formée encore de cellules à grandes vacuoles aqueuses qui commencent seulement à se fragmenter. Il est donc possible de connaître toutes les étapes de la formation des grains d'aleurone sur une coupe transversale d'albumen, dans une graine de cet âge.

Pour observer les cellules profondes d'albumen vivantes et colorées vitalement, certaines précautions sont indispensables : la coloration doit se faire sur une tranche coupée, transversale ou longitudinale, de l'albumen : mais on ne doit pratiquer la coupe destinée à l'observation qu'une fois la coloration effectuée, autrement on aurait peu de chances de conserver des cellules vivantes. Le fragment d'albumen étant placé dans la solution colorante, la teinture pénètre peu à peu par la surface de section, au delà de la zone des cellules lésées par le rasoir, et vient produire des colorations vitales dans les éléments plus profonds. Quand on estime que la teinte est suffisante, on fait une coupe épaisse qu'on examine immédiatement dans l'eau : les cellules colorées vitalement se détachent nettement au milieu des éléments altérés et sont protégés par eux, ce qui permet une observation de plusieurs minutes. Il est certain que cette technique, rendue nécessaire par la position des cellules profondes, donne moins de garantie que l'observation des cellules périphériques, protégées par des membranes continues. Même lorsqu'une cellule est colorée vitalement et qu'on a l'assurance de sa vitalité, il se peut que

l'appareil vacuolaire très sensible soit néanmoins altéré par suite du contact de l'eau, car l'entrée du colorant vital ne peut guère se comprendre qu'accompagnée d'une pénétration correspondante de l'eau dans laquelle il est dissout. Nous nous sommes assurés d'ailleurs que ce phénomène pouvait se produire et nous avons pu assister dans une cellule vivante à la confluence de plusieurs vacuoles par suite de fluidification ; malgré tout, ces faits sont relativement rares et lorsqu'on connaît une fois ces cas anormaux on les distingue facilement des faits vitaux.

Sur une coupe transversale d'albumen, dans une graine à coque noirâtre, non très dure, on observe tous les états du vacuome depuis les grandes vacuoles des cellules les plus profondes, jusqu'aux grains d'aleurone à inclusions des éléments de surface : les états intermédiaires du vacuome, faisant transition, sont donc normaux et réels comme les termes eux-mêmes. Pour avoir une certitude plus complète encore, nous avons examiné plusieurs fois des coupes épaisses d'albumen, aussitôt faites, sans aucun réactif et à sec, afin de vérifier l'exactitude de notre description.

La formation des grains d'aleurone a lieu de la façon suivante. Le morcellement des grandes vacuoles primitives donne naissance par division à un petit nombre d'assez grosses vacuoles disposées autour du noyau central (*fig.* 10, *pl.* V) ; puis ces vacuoles elles-mêmes se divisent, pour donner un certain nombre de vacuoles assez grosses, dont le suc est très épais et qui deviendront chacune un grain d'aleurone. Les inclusions apparaissent assez tard dans le liquide des vacuoles où elles sont d'abord petites et animées de mouvements browniens (*fig.* 14, *pl.* V). Leur forme est très variable : elles restent incolores en coloration vitale.

Enfin au contact de la couche périphérique, il y a des grains d'aleurone complètement formés avec inclusions caractéristiques (cristalloïdes et globoïdes), sans que j'ai pu déterminer laquelle des deux inclusions apparaissait la première (*fig.* 12, *pl.* V).

ART. 2. — ETUDE DE L'ALEURONE DANS LA GRAINE MURE.

Indications techniques.

La graine mûre du Ricin se prête mal à une coloration vitale de l'aleurone. On sait en effet que les grains d'aleurone du Ricin ne peuvent pas être observés sans précaution spéciale, par suite du très rapide bouleversement que produit l'arrivée de l'eau dans les grains d'aleurone, dont la substance a la propriété de se fluidifier rapidement dans ces conditions. En outre l'abondance de l'huile qui s'échappe des cellules, vient obscurcir complètement la préparation la plus soigneusement montée. Tout ces graves inconvénients expliquent que les auteurs, qui ont étudié les grains d'aleurone du Ricin, aient employé des méthodes spéciales d'observation.

De nombreux procédés de fixation ont été préconisés : les principaux sont l'alcool absolu, l'acide picrique, le sublimé, le formol. Ils donnent de bons résultats dont nous parlerons plus loin. On a recommandé également l'observation des coupes fraiches d'albumen dans l'huile et ce n'est pas un mauvais moyen de connaître l'état des grains d'aleurone dans la graine. A côté de ces méthodes classiques, nous devons décrire celle qui nous a servi à obtenir des colorations vitales de l'aleurone.

A. — **Cellules périphériques d'albumen.**

Ces cellules forment une seule assise continue qui entoure complètement l'albumen. Dans la graine, elles sont recouvertes directement par une pellicule mince, formée de cellules mortes, qui représente le reste des téguments ovulaires. Cette pellicule, qui adhère d'une façon très intime à l'albumen, doit être enlevée pour que l'on puisse observer la surface de celui-ci.

Cette opération est assez difficile à réussir sur la graine sèche sans endommager l'albumen ; cependant quand on est parvenu à dénuder une petite portion de ce dernier, il est

possible de pratiquer une coupe mince tangentielle et d'observer la couche des cellules périphériques, après l'avoir déposée à plat sur une lamelle. On voit ainsi à sec, avec un grossissement moyen, que cette assise est formée de grandes cellules allongées, amincies en pointes aux extrémités et dont l'ensemble rappelle la disposition d'un épiderme.

Il n'est pas possible, par contre, au moyen de cette méthode, d'obtenir une coloration vitale, car les cellules sont rapidement tuées ; nous avons donc employé l'artifice suivant :

Les albumens intacts, tels qu'on les extrait de la coque séminale, sont placés entiers dans une solution concentrée de rouge neutre : ils comprennent alors l'albumen proprement dit et l'embryon, le tout recouvert par la pellicule ovulaire.

Au bout d'une demi-heure environ, la surface de l'objet a pris une teinte brun rouge. On enlève alors la pellicule extérieure, qui se détache à ce moment avec facilité et l'on met à découvert la surface extérieure de l'albumen, qui a pris une teinte brun jaunâtre peu foncée.

Cette coloration est due à la pénétration du rouge neutre qui est passé à travers la zone des cellules mortes, puis est venu donner une coloration vitale dans les cellules périphériques d'albumen. Il suffit en effet, de pratiquer une coupe mince tangentielle de la surface colorée et de l'observer à plat, pour se rendre compte qu'il s'agit d'une parfaite coloration vitale.

Dans chaque cellule d'albumen, on constate la présence d'un noyau central étoilé, non coloré et de grains d'aleurone nombreux et petits, arrondis, teints d'une matière homogène par le rouge neutre en rouge brique foncé. Entre les grains d'aleurone, se trouvent de nombreux globules d'huile qui donnent au cytoplasme un aspect alvéolaire (1).

On peut encore observer une coloration vitale des cellules périphériques dans la région de l'albumen correspondant au micropyle de l'ovule. Il existe là une zone assez large, en

(1) Le cytoplasme est donc réduit à un réseau, pressé entre les globules d'huile et les grains d'aleurone.

forme de pyramide très surbaissée à trois faces, qui n'est pas normalement recouverte par les téguments ovulaires : la surface de l'albumen s'y trouve donc à nu et le colorant vital y pénètre rapidement, lorsqu'on place l'albumen entier dans la solution de rouge neutre. Les cellules y sont plus courtes qu'ailleurs et elles renferment des grains d'aleurone assez gros, se colorant en totalité par le rouge neutre.

B. — **Cellules profondes.**

Les cellules profondes d'albumen ne diffèrent pas essentiellement des cellules périphériques que nous venons d'étudier, mais elles sont plus volumineuses et cela d'autant plus qu'on s'éloigne de la surface.

En outre, elles renferment des grains d'aleurone beaucoup plus gros qui contiennent des inclusions.

Les cellules qui sont immédiatement sous jacentes à la couche périphérique ont des cristalloïdes, mais sont dépourvues ordinairement de globoïdes. Plus profondément, au contraire, les grains d'aleurone ont des inclusions complètes (cristalloïdes et globoïdes).

1. *Cellules sous jacentes à la couche périphérique.* — Pour opérer une coloration vitale, nous avons enlevé la coque de la graine et placé l'albumen entier dans une solution diluée de rouge neutre. Au bout de deux minutes, la pellicule mince qui recouvre la surface de l'albumen se détache facilement; on met à nu de cette façon la couche périphérique de l'albumen qui apparaît intacte lorsqu'on a enlevé avec précaution la pellicule.

Si on replace alors l'albumen dans le colorant, on constate au bout de quelque temps à l'examen microscopique que la couche périphérique de l'albumen est tuée et montre seulement ses noyaux colorés. Au contraire l'assise sous jacente apparaît colorée vitalement d'une manière très belle et comme l'assise

épidermique est très mince, formée de cellules très plates, il est facile d'observer les éléments qu'elle recouvre et protège. Ceux-ci montrent des grains d'aleurone dont la substance fondamentale est colorée en orangé et chaque grain contient un cristalloïde incolore, mais est dépourvu de globoïdes. C'est un état de l'aleurone intermédiaire entre celui de l'assise périphérique et celui des cellules profondes.

Le procédé que nous indiquons est un des meilleurs qui soit pour étudier des cellules d'albumen en coloration vitale, sans que l'arrivée de l'eau produise d'altération nuisible à une bonne observation, en même temps qu'à une image exacte de la réalité. Il est certain que cette méthode permet l'observation des grains d'aleurone dans d'aussi bonnes conditions que si l'on emploie une des méthodes de fixation classique. Elle a en outre l'avantage d'être très rapide, (elle demande une demi-heure à peine) et elle permet de mettre en valeur les propriétés de la substance fondamentale de l'aleurone.

Lorsqu'on a opéré de cette façon, il se produit bien une entrée de l'eau dans la cellule, puisque le colorant ne peut arriver au contact des grains d'aleurone que dissout dans l'eau, mais cette arrivée est ménagée et n'amène pas de pertubations, comme ce serait le cas pour des cellules d'albumen qui se trouveraient en contact direct avec l'eau. La couche périphérique de cellules mortes qui est interposée, suffit à protéger contre cet effet la couche sous jacente.

2. *Cellules de la masse de l'albumen.* — Il est très difficile d'en faire l'observation vitale dans la graine mûre. Les artifices employés pour les autres cellules ne peuvent servir dans ce cas.

Il n'est cependant pas complètement impossible de faire de bonnes colorations vitales en opérant de la façon suivante :

On coupe un albumen en deux parties, sur lesquelles on refait avec le rasoir une surface de section bien plane et bien nette, puis on immerge les moitiés dans le bain colorant. Au bout de quelques heures, la zone coupée a pris une teinte rouge

brique foncée : on fait alors une coupe épaisse qu'on observe à un grossissement moyen.

Les cellules coupées sont vidées en général de leur contenu et leurs membranes seules sont colorées : au dessous d'elles, on distinguera généralement un certain nombre de cellules d'albumen colorées vitalement au milieu d'autres cellules mortes. Dans les cellules colorées, on remarque les *grains d'aleurone* qui ont leur taille et leur forme ordinaire et ne sont pas déformés : leur substance fondamentale est colorée en rouge brique et les inclusions sont restées incolores : tout le reste de la cellule demeure sans coloration. Il s'agit donc d'une coloration vitale, que seule l'épaisseur de la coupe et le trouble produit par les cellules désorganisées empêche d'examiner d'une façon détaillée.

Nous voyons donc que la méthode vitale peut s'appliquer à l'albumen mûr de Ricin. Outre sa rapidité, cette méthode a l'avantage de mettre en évidence les propriétés de l'aleurone et de laisser voir en même temps l'huile, et le réseau cytoplasmique, ce que ne permettent pas de faire la plupart des méthodes de fixation qui produisent une dissolution de l'huile. Nous avons aussi obtenu des images de la cellule d'albumen de Ricin plus exactes que celles qui avaient été décrites jusqu'à présent. Elles sont entièrement comparables à celles que nous avons obtenues par l'emploi d'une méthode de fixation spéciale *la méthode de Regaud.*

ART. 3. — EVOLUTION DE L'ALEURONE PENDANT LA GERMINATION DU RICIN.

Les conditions d'humidité et de chaleur auxquelles sont soumises les graines en germination, déterminent dans l'albumen des modifications, qui se manifestent bien avant que la plantule se soit fait jour au dehors. Ainsi pendant toute une période, que l'on pourrait appeler pré-germinative, durant laquelle la graine est encore apparemment en sommeil, il se

produit des remaniements internes très importants. Nous ne nous occuperons ici que des transformations qui intéressent les grains d'aleurone.

Nous avons vu que ces derniers dans la graine mûre étaient bien individualisés, toujours arrondis et qu'ils pouvaient renfermer des inclusions (cellules profondes) ou en être dépourvus (cellules périphériques).

Leur évolution en cours de germination est très rapide (1).

A. — **Cellules périphériques.**

Au bout de six jours de germination, alors que la coque de la graine n'est pas éclatée, la couche externe de l'albumen montre encore quelques grains d'aleurone isolés, mais dans la plupart des cellules, les grains se sont déformés et ils se sont réunis ensemble en un réseau dont les points d'intersection sont occupés par une masse plus importante de métachromatine correspondant aux grains d'aleurone primitifs. Les trabécules sont très fins et serpentent dans les intervalles laissés libres au milieu de l'huile qui est toujours très abondante (*fig.* 2 *et* 3, *pl. VI*).

Ces réseaux correspondent plutôt à un brassage, une remise en mouvement des substances contenues dans la cellule : il n'y a pas encore de véritable hydratation du vacuome. Il se fait d'abord certainement une sorte d'imbibition d'ensemble de la cellule et le vacuome ne donne pas l'impression d'avoir subi encore un accroissement de volume. Il est probable, au contraire, qu'une partie de sa substance est utilisée ailleurs pendant cette période. L'arrivée de l'eau dans le vacuome au début de la germination a donc lieu d'une façon ménagée.

Dans les stades ultérieurs, l'hydratation du vacuome amène son gonflement : les réseaux très fins se transforment en réseaux à éléments gros et courts, puis en masses irrégulièrement lobées. Le système vacuolaire a pris dans la cellule une

(1) Les germinations ont été obtenues à l'étuve à une température de 20°.

importance de plus en plus grande, tandis que l'huile, par contre, est devenue de moins en moins abondante (*fig.* 5, *pl. VI*). Ces états sont fréquents dans l'albumen d'une graine dont la radicule atteint un demi-centimètre de longueur ; on les trouve, en même temps que des stades moins évolués en réseau fin et des stades plus avancés de grosses vacuoles dont nous allons parler maintenant. Lorsque le vacuome en effet, s'est transformé en masses assez grosses irrégulièrement déformées, il arrive que les diverses parties de ces vacuoles se séparent et s'isolent sous forme de grosses sphères qui s'arrondissent bientôt (*fig.* 6, *pl. VI*). Souvent même, tout l'appareil se mue en une volumineuse vacuole. A cet état, ces éléments sont encore riches en produits albuminoïdes : la teinte prise en coloration vitale est encore très intense, rouge brique foncé avec le rouge neutre, violet avec le bleu de crésyl et le suc vacuolaire encore très épais (*fig.* 7, *pl. VI*).

L'huile existe, mais sous forme de gouttelettes séparées très nombreuses, au lieu de se trouver comme précédemment à l'état d'émulsion compacte.

Lorsque la jeune plantule montre une radicule de trois ou quatre centimètres de longueur, on ne trouve plus dans la couche externe de l'albumen que des cellules à grandes vacuoles uniques : le suc vacuolaire apparaît de moins en moins concentré.

Enfin, quand la plantule a acquis une racine de sept ou huit centimètres, on remarque que les cellules périphériques d'albumen prennent encore assez bien le colorant vital, mais la teinte prise est pâle. En outre, le suc vacuolaire qui était alcalin jusque là, devient acide car le rouge neutre prend une teinte rosée. A côté des cellules colorées vivantes, d'autres sont mortes et désorganisées : les cellules sont devenues énormes et elles commencent à se désagréger. Le cytoplasme, à la fin, renferme des globules nombreux assez gros dont la nature est incertaine (*fig.* 8, *pl. VI*).

B — Cellules profondes d'albumen.

L'évolution des grains d'aleurone en vacuoles est d'une façon générale plus rapide dans la masse de l'albumen que dans les cellules périphériques, mais les changements se manifestent moins tôt.

Lorsque la racine se montre au dehors, il y a encore dans la plupart des cellules des vacuoles à inclusions très nettes. Les inclusions sont devenues très rares lorsque la racine a un centimètre ou deux de longueur et on en chercherait vainement sur des germinations plus avancées : la disparition des inclusions est donc très rapide.

Pour observer les cellules profondes d'albumen, il faut procéder de la manière dont il a été question au chapitre de la maturation. La coloration s'opère sur des tranches coupées de l'albumen et l'observation se fait sur des couches épaisses que l'on monte dans l'eau et que l'on observe immédiatement. Il arrive souvent que sur une coupe, seules quelques cellules sont intactes, bien colorées et se prêtent à l'examen microscopique. Parfois même la coupe tout entière est inutilisable ; il y a donc de très réelles difficultés à suivre les modifications du vacuome au cours de la germination, dans les cellules vivantes.

Au début, et jusqu'au stade où la racine pointe, les modifications consistent en la liquéfaction de la substance fondamentale qui se transforme en une vacuole arrondie ou ovale contenant les inclusions peu modifiées (*fig.* 9, *pl. VI*).

Par suite du gonflement, si plusieurs vacuoles viennent au contact, elles se fusionnent et les inclusions de l'une et de l'autre réunies ensemble s'accolent en un petit groupe caractéristique. La dilution de plus en plus grande de la solution de protéine entraîne la formation de précipitations qui se produisent de la façon suivante. Le dépôt du précipité coloré peut avoir lieu autour des inclusions ou sur le bord de la

vacuole ; le reste de la cavité, dans ce cas, devient incolore ou à peine teinté (*fig.* 12, *pl. VI*) et (*fig.* 10, *pl. VI*).

Lorsque la racine a un centimètre de longueur, on trouve déjà, au dessous de la couche externe, de grandes vacuoles dont les inclusions ont complètement disparu (*fig.* 11, *pl. VI*). Sur une plantule plus âgée dont la racine a six centimètres par exemple, les cellules d'albumen prennent encore le colorant vital, mais la teinte prise est beaucoup plus pâle et il se fait une facile précipitation de globules colorés ; parfois même ces globules sont émis en dehors des vacuoles et paraissent libres au milieu du cytoplasme. Ce dernier se trouve, à cette période, rempli de gros globules qui réduisent faiblement l'acide osmique. Il est certain que la majorité des réserves contenues dans l'albumen est alors passée dans la jeune plantule et la suite de l'évolution de l'albumen consiste en une désorganisation progressive et une destruction des cellules d'albumen.

C. — **Cellules de la couche interne de l'albumen, au contact des cotylédons.**

Dans les graines germées, de même que dans les graines au repos, les cotylédons foliacés de la plantule sont en contact intime avec la couche interne de l'albumen. Dans la graine mûre, ce contact est assez étroit, pour qu'il soit impossible de séparer les cotylédons de l'albumen sans dommage pour celui ci, mais dès que la graine germe, il devient facile de détacher une portion du cotylédon, pour mettre à nu une zone assez étendue de la couche interne de l'albumen ; si alors on fait agir une solution de rouge neutre sur cette surface très perméable, on obtient rapidement la fixation du colorant vital par les cellules ; on fait alors une coupe tangentielle de l'albumen et on observe immédiatement au microscope.

L'intérêt de cette partie de l'albumen consiste dans la possibilité qu'elle offre, d'être colorée vitalement dans des conditions de vie normale, ce qui n'est pas réalisable pour les

cellules profondes d'albumen dont nous venons de faire l'étude et qu'il nous a fallu colorer sur des coupes.

D'autre part, cette assise contient des éléments à gros grains d'aleurone du type des cellules profondes, qui renferment les inclusions caractéristiques et sa situation au contact immédiat des cotylédons, lui donne un rôle certainement un peu spécial par rapport aux autres portions de l'albumen.

Pendant les premières périodes de la germination cette assise conserve des grains d'aleurone presque intacts.

Tout à fait au début et lorsque la coque de la graine est seulement éclatée, on peut observer de belles colorations vitales des cellules d'albumen, telles qu'elles ont été représentées (*fig.* 13, *pl.* V).

Dans les cellules les moins modifiées, les gros grains d'aleurone n'ont subi qu'un léger gonflement et leur aspect diffère peu de celui qui existe dans une graine à l'état de repos. Dans les intervalles de ces grains on en observe de beaucoup plus petits, colorés en rouge brique, qui sont assez souvent dépourvus d'inclusions ; ils sont parfois encore arrondis, comme dans la graine à l'état de vie ralentie, mais la plupart du temps, dès ce premier stade de la germination, on les trouve déformés, allongés, souvent étirés d'une façon considérable ; plusieurs de ces corpuscules aleuriques arrivent à se joindre entre eux et l'on observe alors des ébauches de réunion en réseau.

Pendant ce temps, on constate que les gros grains d'aleurone n'ont pas encore été modifiés et conservent leur forme ovale ou sphérique. Plus tard, sur des germinations plus évoluées (lg. racine = 1/2 cm.) on les observe à leur tour comprimés et déformés et les inclusions persistent encore très visibles comme des enclaves non colorées.

Dans les stades suivants, (lg. rac = 1 cm.) les réseaux vacuolaires sont plus rares et les inclusions sont partiellement dissoutes : les cellules qui renferment de grandes vacuoles à contenu homogène sont fréquentes. Ces vacuoles absorbent

encore très énergiquement le rouge neutre et se colorent en rouge brique foncé. Le contenu protéique est donc toujours abondant et il arrive qu'il se précipite en globules rouges plus colorés que le reste de la vacuole.

La transformation des grains d'aleurone en vacuoles, qui s'opère à ce moment, a lieu très rapidement comme le montrent les indications suivantes : sur des germinations dont la racine atteint un centimètre de longueur, on peut encore trouver des grains d'aleurone reconnaissables renfermant leur inclusions : sur des germinations dont la racine a une longueur de deux centimètres, il n'y a plus que de grandes vacuoles dans cette assise interne de l'albumen et toute trace d'inclusions a disparu de ces vacuoles.

ART. 4. — ETUDE DE L'ALBUMEN AU MOYEN DE LA MÉTHODE DE REGAUD.

A — Cytologie de l'albumen un peu avant maturation (Méthode de Regaud).

Les cellules profondes d'albumen ont un noyau toujours central, nucléolé ; sa forme est étoilée et il se rattache aux trabécules du cytoplasme environnant. Cet aspect du noyau correspond exactement à celui que l'on observe sur le vivant (préparation d'albumen observée à sec) (*fig.* 1 et 2, *pl. XIII*).

Par la méthode de Regaud, l'huile est dissoute dans les préparations (au cours du passage par le xylol), et il reste dans la cellule, à la place qu'occupaient les globules d'huile, des espaces clairs qui sont limités par les trabécules du protoplasme colorés en gris pâle. La fixation est donc excellente, puisqu'elle reproduit sans déformation l'aspect alvéolaire que nous avons décrit dans la cellule vivante.

Les grains d'aleurone se trouvent comme les sphérules d'huile entourés par le cytoplasme. Leur forme est bien conservée ; leurs caractères de coloration par l'hématoxyline sont les suivants :

Les globoïdes ne se sont pas colorés et apparaissent comme des vacuoles incolores : le cristalloïde peu chromatique apparaît presque sans coloration naturelle, mais souvent il possède à sa surface un enduit chromatique qui provient du dépôt à sa périphérie de la substance fondamentale protéique. Celle-ci fixe très énergiquement l'hématoxyline et elle peut se précipiter de plusieurs manières, soit autour du cristalloïde où elle forme le dépôt dont nous venons de parler, soit sur la paroi externe de la vacuole aleurique, soit autour du globoïde. Enfin, il peut arriver qu'il n'y ait pas précipitation du tout et que toute la substance fondamentale soit colorée en gris foncé homogène.

Le dépôt à la surface du cristalloïde peut affecter des formes très particulières, en réseau par exemple, comme l'indique la figure (*fig. 3, pl. XIII*).

Ces états provenant d'une précipitation effectuée irrégulièrement, sont très variables. On ne les observe pas en coloration vitale, car dans ces stades le suc vacuolaire très épais ne se précipite pas sous l'influence du colorant vital, tandis qu'il se coagule et se contracte de diverses façons par l'action du fixateur.

Enfin, il existe dans le cytoplasme et presque toujours aux angles du réseau qu'il forme, des granulations et de très courts bâtonnets fortement colorés en noir alors que les trabécules eux-mêmes sont gris (*fig. 3, pl. XIII*).

Ces éléments sont de tailles diverses et il est assez difficile de faire une distinction entre eux, néanmoins les plus gros paraissent représenter des plastes.

B. — **Cytologie de l'albumen d'une graine mûre.**

Le liquide de Regaud donne une fixation très bonne de l'albumen mûr de Ricin ; on peut s'assurer au moyen d'acide osmique que l'huile n'est pas dissoute et qu'elle est conservée par ce procédé. (Elle est dissoute au contraire dans les fixateurs à base d'alcool absolu.)

On peut faire toute une série d'observations sur des albumens ainsi fixés.

1° Observations sans coloration.

On fait une coupe tangentielle d'albumen et on observe à plat les cellules de la couche périphérique ; elles montrent de nombreux corps réfringents très petits qui correspondent aux grains d'aleurone. Si on emploie ensuite un peu d'alcool iodé, on distingue que ces petits grains arrondis contiennent de petites inclusions de grosseur variée. Par conséquent, la fixation au Regaud donne lieu à une précipitation de granules dans les grains d'aleurone primitivement homogènes. (Comparer avec l'étude vitale.)

Dans les cellules profondes, sur une coupe mince d'albumen, on voit de gros grains d'aleurone qui contiennent un cristalloïde et d'assez nombreux petits corpuscules arrondis (6 à 8 environ) qui sont des précipitations dans la substance fondamentale. Après l'action de l'alcool iodé, le cristalloïde montre une belle teinte jaune, tandis que les granules précipités dans le vacuole aleurique et le globoïde restent incolores.

2° Observation après coloration.

a) *Rouge neutre.* — Après décoloration à l'alcool absolu, on observe que le cristalloïde demeure coloré en rouge orangé et que les grains de protéine sont rouges ; la substance fondamentale est décolorée. Cet essai montre que les propriétés chromatiques du grain d'aleurone sont bien différentes, suivant qu'il s'agit d'une coloration vitale, ou d'une coloration léthale.

Dans le premier cas, la substance fondamentale se teint en rouge orangé et le cristalloïde demeure incolore ainsi que le globoïde; dans le deuxième cas, les grains de protéine, précipités à l'intérieur de la substance fondamentale, se teignent en rouge ainsi que le cristalloïde, tandis que le globoïde demeure incolore.

b) Bleu de crésyl à 1 0/0 (10 minutes, régression à l'alcool absolu, montage au baume).

Dans les cellules profondes, le cristalloïde et la substance fondamentale sont bleues, les grains de protéine sont rouges métachromatiques ainsi que le globoïde. Quelquefois, le globoïde n'est pas distinct et il existe seulement à l'intérieur de la substance fondamentale de nombreux petits granules métachromatiques colorés en rouge vineux (*fig.* 16, *pl. V*).

Comme dans le cas du rouge neutre, la coloration léthale donne des résultats assez différents de la coloration vitale, car dans les cellules vivantes le globoïde n'est jamais coloré par le bleu de crésyl. (Comparer les figures).

c) Coloration à l'hématoxyline ferrique sur des coupes en série d'albumen (*coupes au microtome, épaisseur 5 μ*).

Cellules phériphériques d'albumen. — Ces cellules sont très allongées, mais leur épaisseur est faible. Le noyau a une situation centrale, il est étoilé et pourvu d'un gros nucléole Le cytoplasme apparaît comme alvéolaire parce qu'il est réduit à des trabécules entourant les cavités où l'huile a été dissoute. Il renferme des petites granulations très colorées. Les grains d'aleurone sont assez petits et ils se montrent colorés en noir intense : ces grains ne sont entourés d'aucune auréole hyaline pouvant indiquer une contraction et ils ne renferment pas d'inclusions, leur contenu se montrant coloré en totalité (*fig.* 5, *pl. XIII*).

Cellules profondes. — On peut distinguer après fixation et coloration les éléments suivants : le noyau a une position centrale ; il est relativement petit par rapport à la taille de la cellule. Sa forme est étoilée et comme sa membrane d'enveloppe est peu visible, il donne l'impression de se continuer avec les filaments cytoplasmiques qui s'en détachent (*fig.* 13, *pl. XIII*).

Le cytoplasme a une disposition réticulée très nette et les mailles du réseau sont occupées par des espaces clairs qui représentent l'emplacement qu'occupaient les globules d'huile, dissous au cours du montage des préparations.

Aux angles du réseau de cytoplasme, s'observent plusieurs sortes de granulations et des bâtonnets qu'il est assez difficile d'identifier. Les plus gros représentent très probablement des plastes : les plus petits des microsomes, mais il n'existe pas une distinction très nette entre ces deux catégories d'éléments. Dans tous les cas, il n'existe pas de filaments onduleux mais uniquement des grains irréguliers et des bâtonnets peu allongés.

Les grains d'aleurone sont gros et ovales, non déformés par la fixation, entourés par une très mince couche de cytoplasme qui se relie par de fins trabécules au réseau environnant. Ils renferment les inclusions connues : cristalloïdes et un ou plusieurs globoïdes.

Si la régression a été peu poussée, la substance fondamentale et le cristalloïde sont noirs et se confondent entre eux ; si au contraire, la décoloration a duré plus longtemps, le cristalloïde décoloré est gris clair et son contenu est nettement distinct de la substance fondamentale, qui est restée encore foncée. Il y a donc une assez grande différence de chromaticité entre le cristalloïde et la protéine. Cette dernière substance apparaît souvent à l'état de granulations noires précipitées à l'intérieur de la vacuole aleurique, ou bien encore elle peut former un dépôt chromatique à la surface du cristalloïde et le masquer plus ou moins complètement (1).

Les globoïdes sont au contraire toujours incolores et présentent l'aspect de vacuoles claires arrondies au sein de la substance du grain.

C. — Cytologie de l'Albumen germé par la Méthode de Regaud.

Les grains d'aleurone se transforment en vacuoles très colorées au début parce qu'elles sont riches en albuminoïdes. La protéine forme alors un fin précipité granuleux coloré en noir (*fig.* 9, *pl. XIII*). Ce précipité peut même constituer un dépôt

(1) C'est à ce dépôt plutôt qu'à sa coloration propre que le cristalloïde doit parfois d'être distingué difficilement

assez ténu pour donner à la vésicule aleurique une apparence homogène : au sein de la vacuole se trouvent libres les cristalloïdes très diminués de taille et les globoïdes généralement fragmentés (*fig.* 11 *et* 12, *pl. XIII*).

Les préparations fixées montrent des stades de fusion de vacuoles et des masses vacuolaires irrégulièrement lobées, tout à fait comparables à celles qu'on observe vitalement, colorés par le rouge neutre. Les précipitations colorables en rouge foncé par le colorant vital et disposées souvent en croûte chromatique sur les cristalloïdes, sont représentées sur les préparations fixées par un enduit noir très foncé. La concordance des observations est donc complète (*fig.* 4 *et* 10, *pl. XIII*).

Le cytoplasme présente toujours une disposition alvéolaire, mais, pendant la germination, on peut remarquer que l'huile est incomplètement dissoute dans les préparations, ce qui indique que sa nature chimique s'est modifiée ; il existe encore quelques zones étroites où l'huile a disparu entièrement, mais partout ailleurs, une légère coloration grise révèle la présence d'un corps huileux particulier.

Les granulations du cytoplasme sont très visibles comme des corpuscules assez gros, très colorés. La plupart me paraissent représenter des plastes qui ont grossi pendant la germination et peuvent même parfois, comme on le sait sécréter de l'amidon. On n'observe aucun aspect correspondant à des chondriocontes allongés (*fig.* 4 *et* 8, *pl. XIII*).

Le noyau, pendant ces stades, est gros, vésiculeux, nucléolé.

L'albumen provenant de germinations plus âgées (lg. racine 1 cm. 50) montre des cellules à grandes vacuoles souvent uniques par cellules qui résultent de la fusion entre elles des vacuoles aleuriques précédemment décrites. Ces grandes vacuoles ont encore un contenu granuleux noir foncé, de sorte qu'on pourrait méconnaître leur nature. Au contraire, les espaces clairs qui sont visibles à ce moment dans le cytoplasme, ne sont pas de véritables vacuoles, mais des espaces occupés antérieurement par de l'huile.

Les vacuoles aleuriques renferment souvent encore des cristalloïdes de faible taille reconnaissables cependant à leurs formes anguleuses. Ils sont recouverts en général d'un enduit chromatique comparable à la croûte chromatique que nous avons décrite en coloration vitale et ils doivent se dissoudre peu à peu au début sans se fragmenter, car on n'observe que très peu de cristalloïdes morcelés. Ils présentent parfois un double contour souligné par une forte coloration noire; à la fin de la digestion, les cristalloïdes se fragmentent, car ils se montrent comme des masses globuleuses irrégulières très colorées par suite du dépôt de la protéine à leur surface; ces masses mamelonnées qui n'ont plus aucune structure visible correspondent exactement à ce que nous avons décrit sur les cellules vivantes (*fig.* 8, *pl. XIII*).

De même, le suc vacuolaire devenant très fluide, la protéine se dépose en corpuscules très colorés sur la paroi externe de la vacuole et il arrive alors que l'intérieur même de la vésicule est presque complètement décoloré. D'autre fois, la protéine étant devenue encore moins abondante, la vacuole finit par ne plus renfermer que des granulations éparses. Ces aspects ont déjà été signalés en coloration vitale.

Au début, les globoïdes fragmentés sont encore présents parfois : ce sont alors des espaces arrondis clairs contenant un corpuscule incolore à leur intérieur. Ils disparaissent plus tôt que les cristalloïdes, mais c'est la protéine qui persiste le plus longtemps sous forme de granulations chromatiques clairsemées.

Conclusions au sujet de l'emploi de la méthode de Regaud.

Les grains d'aleurone sont très bien fixés par la méthode de Regaud. La substance fondamentale protéique a des propriétés chromatiques très intenses et se colore en noir foncé par l'hématoxyline ferrique. Elle forme une solution très épaisse dans les vacuoles aleuriques. Cette solution peut précipiter son contenu en corpuscules variables de formes et de

tailles soit à l'intérieur de la vésicule, soit sur ses parois : la protéine peut encore se déposer à la surface des inclusions en une couche chromatique. Cette précipitation se produit plus facilement pendant les stades de la maturation ou de la germination, alors que les vacuoles aleuriques ont un suc plus aqueux, mais elle a lieu également dans la graine mûre.

Ces résultats correspondent exactement à ceux que nous avions signalés en coloration vitale : les mêmes précipitations s'observent en effet dans ce dernier cas ; cependant, dans la graine mûre et dans les stades voisins, la substance fondamentale se montre ordinairement homogène lorsqu'elle est colorée vitalement.

On voit que c'est la même substance, la protéine du grain qui se montre chromatique par la méthode de Regaud et par la coloration vitale au rouge neutre.

Le cristalloïde peu chromatique après emploi de la méthode de Regaud, est peu colorable par les teintures vitales (incolore avec le rouge neutre, teinté en bleu avec le bleu de crésyl).

Les globoïdes, incolores après fixation et coloration Regaud, sont aussi non colorés vitalement par le rouge neutre ou le bleu de crésyl.

Le cytoplasme des cellules d'albumen présente une disposition alvéolaire avec mailles entourant les espaces occupés par l'huile. Cette disposition correspond exactement à ce qu'on voit dans les cellules vivantes, sauf que le réseau, une fois fixé, paraît moins régulier, parce que les trabécules sont un peu déformés.

Dans le cytoplasme, se trouvent des granulations chromophiles de diverses tailles : elles sont situées principalement aux angles du réticulum. Les plus grosses correspondent aux plastes qui n'ont jamais l'aspect de chondriocontes sinueux, mais sont arrondis ou bien en courts bâtonnets. Les plus petits sont très probablement des microsomes.

Les résultats que nous venons de résumer diffèrent sensiblement de ceux qui ont été donnés par M. Guilliermond récem-

ment. Nous n'avons pas observé comme ce dernier de longs chondriocontes sinueux, et la description du cytoplasme et des grains d'aleurone donnée par l'auteur me paraît incomplète. Notre conception du cytoplasme des cellules d'albumen s'accorde mieux avec les données plus anciennes de M. Beauverie qui avait employé des fixations au formol.

En ce qui concerne la métachromatine, on sait que M. Beauverie a comparé la substance azotée des globoïdes à la métachromatine des Algues et des Champignons. En réalité, si le globoïde se colore d'une façon métachromatique par les couleurs d'aniline (bleu de crésyl, bleu de méthylène), il n'est pas seul à se comporter ainsi et il existe toujours comme nous l'avons montré précédemment dans la graine mûre, de petits corpuscules protéiques précipités dans la substance fondamentale aleurique et qui se teignent métachromatiquement. Il en résulte qu'une partie tout au moins de la substance fondamentale aleurique, possède des propriétés voisines de celles de la métachromatine ; elle a en outre le caractère de fixer les colorants vitaux avec métachromasie comme nous l'avons vu. On peut considérer qu'une part importante de la protéine des grains d'aleurone du Ricin est formée par de la métachromatine ayant des propriétés voisines de celles des Algues et des Champignons.

APPENDICE AU CHAPITRE II

Remarques sur la digestion de l'albumen du Ricin.

Sur les préparations d'albumen provenant de graines germées (long. racine = 1 cm 1/2) on peut faire une remarque très importante au sujet de la digestion de l'albumen.

Des grains d'aleurone encore reconnaissables et renfermant des cristalloïdes encore volumineux et une substance protéique

abondante, sont encore fréquents à la partie interne de l'albumen au contact des cotylédons foliacés. Au contraire, plus on se rapproche de la périphérie de l'albumen, plus on observe une digestion avancée et moins les vacuoles apparaissent chromatiques. Il en résulte que la digestion de l'albumen se produit plus vite et plus tôt à la périphérie qu'à la partie interne. C'est ce que montre également l'observation vitale, car lorsque la plantule possède une radicule de 1 centimètre de long, on constate qu'il existe encore à ce moment des grains d'aleurone presque intacts, dans les cellules d'albumen de la couche interne au contact des cotylédons. Plus loin au contraire, il n'y a que des vacuoles plus ou moins fusionnées entre elles.

Ces conclusions sont un peu inattendues, car elles montrent que la jeune plantule de Ricin commence par absorber les parties de l'albumen les plus éloignées et qu'elle consomme en dernier lieu les réserves qui sont à son contact immédiat.

C'est l'inverse de ce qui a lieu pendant la digestion de l'albumen amylacé des Graminées qui commence au contact soit de l'assise protéique soit du scutellum. L'explication doit en être cherchée dans les propriétés différentes bien connues des deux albumens. Chez le Ricin, l'albumen est un tissu vivant qui se digère lui-même tout en gardant sa vitalité jusqu'au bout ; chez les Graminées, l'albumen est un tissu mort qui est digéré au moyen de diastases émises par les tissus environnants (assise protéique, scutellum).

On sait très bien que l'albumen du Ricin isolé de son embryon, peut commencer seul sa propre digestion. Mais cela n'empêcherait pas évidemment que les cotylédons de la plantule dans une germination normale, puissent contribuer de leur côté aux mêmes phénomènes. Il ne semble pas qu'il en soit ainsi d'après nos observations, du moins en ce qui concerne l'aleurone puisque les grains aleuriques demeurent assez longtemps intacts au voisinage des cotylédons. Nous pensons que l'accès de l'eau dans l'albumen, doit jouer un

grand rôle pour la solubilisation des réserves ; or pendant les premiers stades de la germination, l'eau arrive beaucoup plus facilement dans les régions périphériques de l'albumen, d'où il s'ensuit une digestion plus rapide. Cette explication me paraît meilleure que celle qui consisterait à reconnaître aux seules cellules périphériques, des propriétés de sécrétion diastasique spéciales. Nous croyons que dans l'albumen du Ricin toutes les cellules sont capables de fournir les diastases nécessaires aux transformations chimiques de l'aleurone et de l'huile, mais que cette sécrétion se produit plus tôt à la périphérie, à cause de l'arrivée plus précoce de l'eau.

CHAPITRE III.

A. — Aleurone des Graminées.

Indications historiques.

Dans la graine mûre des Graminées, il est généralement très difficile de faire des observations. Les tissus sont desséchés et dans un état de dureté qui rend malaisée la dissociation des divers éléments de l'amande ou la confection des coupes. Mais il suffit de quelques heures de séjour dans l'eau, pour qu'on puisse réussir des colorations vitales et se rendre compte de l'état du vacuome dans les divers tissus.

Les colorations vitales ont été faites, comme précédemment, dans le but de connaître l'évolution de l'aleurone pendant la germination. Il a fallu pour cela observer des séries de plantules à différents âges.

Quelques mots d'historique sont nécessaires, avant d'exposer nos recherches personnelles. Le principal travail de cytologie chez les Graminées, est celui de M. Guilliermond publié en 1908. Ce dernier s'est proposé de rechercher si les corpuscules métachromatiques signalés chez les Protisdes, n'existeraient pas chez les Graminées; il est amené bientôt à reconnaître dans les globoïdes des grains d'aleurone, une substance voisine de la métachromatine, principalement en raison de la teinte métachromatique qu'ils prennent avec la plupart des teintures basiques d'aniline bleues ou violettes. Là ne se bornent pas d'ailleurs les conclusions de l'auteur qui fait une étude spéciale de l'aleurone, pendant la maturation des graines, et

pendant la germination. Il montre que les grains d'aleurone existent dans tous les tissus de l'embryon ; ces grains représentent des vacuoles déshydratées comme le pensait Pfeffer, et, pendant la germination, ils se transforment en vacuoles liquides renfermant des granules de protéine et des globoïdes.

Ces résultats ont été obtenus au moyen de fixations et de colorations et le formol à 40 0/0 a été reconnu comme étant le meilleur fixateur.

Nous n'avons pas l'intention de reprendre une étude semblable à celle qu'a faite M. Guilliermond. Nous nous bornons à exposer comment, par la méthode des colorations vitales, on peut mettre en évidence les phénomènes de l'évolution de l'aleurone, et comment la transformation en vacuoles se produit au cours de la germination. Ce sont là des faits dont les méthodes de fixation ordinaires ne donnent pas une image exacte.

Ce domaine de l'observation vitale est resté quelque peu dans l'ombre jusqu'à présent. Cependant M. Guilliermond, dans le mémoire précédemment cité, publie quelques données sur la coloration vitale des grains d'aleurone, mais uniquement dans les assises protéiques.

En 1919, M. P. A. Dangeard décrit l'évolution vacuolaire dans la radicule de l'Orge ; il montre que l'on peut suivre dans l'épiderme la formation de filaments et de réseaux vacuolaires, aux dépens des grains de métachromatine qui existent dans les cellules les plus jeunes. C'était un des premiers exemples sur lesquels on montrait une évolution du système vacuolaire nouvelle à/cette époque.

Un peu plus tard, en 1921, ces phénomènes sont décrits à nouveau par M. Guilliermond qui confirme la description donnée par M. P.-A. Dangeard et qui montre de plus que, dans les très jeunes plantules, l'évolution en vacuoles se produit à partir des grains d'aleurone.

Cette publication est postérieure à nos premières notes sur l'aleurone et son évolution, chez le Pin maritime et chez le

Ricin. Quelques mois après, nous avons donné la description de l'évolution vacuolaire chez quatre types de Graminées (Blé, Orge, Maïs, Avoine), non seulement dans les radicules, mais aussi dans les jeunes feuilles, le scutellum des jeunes plantules et dans l'assise protéique.

Il est nécessaire aujourd'hui de compléter les résultats indiqués précédemment et d'exposer moins brièvement ceux qui ont été déjà signalés.

Nous commencerons par décrire l'évolution de l'aleurone dans la couche protéique de l'albumen, puis dans les tissus de la plantule.

ART. I. — ALBUMEN.

L'albumen dans les graines étudiées (Blé, Orge, Avoine, Maïs) est toujours formé d'une partie interne dont les cellules sont mortes et ne se colorent pas : cette zone centrale de l'albumen, qui est de beaucoup la plus considérable, est formée de grandes cellules remplies de grains d'amidon extrêmement abondants. Entre ces grains, il y a sans doute un peu de substance albuminoïde, mais celle-ci ne se trouve pas à l'état de grains d'aleurone : le vacuome qui a dû exister avant la maturation est donc devenu complètement indistinct.

La couche externe de l'albumen diffère profondément des précédentes. Elle constitue *l'assise protéique* qui peut être simple ou bien double et même triple (Orge). Cette assise se sépare assez facilement du reste de l'albumen après quelques jours de germination, et elle donne lieu à des colorations vitales remarquables lorsqu'on en place un fragment dans une solution de rouge neutre dilué. Elle est formée de grosses cellules polyédriques à membranes épaisses, qui renferment de très nombreux grains d'aleurone arrondis ou ovales, lesquels fixent le colorant d'une manière intense et lui communiquent une teinte métachromatique.

Dans le cas de l'Orge, il faut trois jours de germination à 22°, pour qu'on puisse facilement séparer l'assise protéique

du reste de l'albumen (1). Cette opération se fait en découpant au moyen d'un scalpel, une petite portion des téguments, de telle sorte que la couche protéique qui y est adhérente se trouve isolée des cellules amylacées. On place ce fragment de tissu dans une solution de rouge neutre ; l'assise protéique absorbe avidement ce colorant par sa face interne, tandis que du côté externe, elle est protégée par l'imperméabilité du tégument séminal. Lorsque la coloration est achevée, on observe la face interne de la couche protéique qui apparaît comme un carrelage régulier de cellules colorées vitalement. Au contact, se trouvent des grains d'amidon de tailles diverses qui sont déjà isolés, mais ne paraissent pas encore sensiblement altérés : quand ils sont trop nombreux, ils gênent l'observation, et l'on doit s'en débarrasser en raclant doucement la face interne de l'assise protéique.

Si, au lieu de germinations d'Orge, on applique le même traitement à de jeunes plants de Blé ou d'Avoine ayant 48 h. ou 24 h. de germination, on obtient des résultats absolument comparables. Avec le Maïs, il est nécessaire d'attendre cinq ou six jours avant que l'état des tissus permette leur dissociation facile.

Nous avons essayé de nous rendre compte de l'état de l'assise protéique après quelques heures seulement de germination. Chez le Maïs, on arrive à isoler l'assise et à la mettre en contact avec le bain colorant, mais les cellules ne se colorent en aucune façon, ce qui tient sans doute à une certaine imperméabilité des membranes au début de la germination.

Les caractères de l'aleurone dans l'assise protéique sont un peu différents dans les quatre types étudiés. L'Orge, le Blé, l'Avoine, ont des grains d'aleurone qui renferment des inclusions : celles-ci sont des globoïdes arrondis, réfringents qui demeurent incolores après teinture vitale. Dans le Blé, on en trouve un, deux, ou trois par corpuscule d'aleurone ; plus

(1) Nous avons observé l'assise protéique au bout de 48 heures, mais l'examen offre une plus grande difficulté Les caractères des cellules sont les mêmes.

rarement quatre ou cinq. Dans l'Orge, un seul globoïde est fréquent. Le Maïs a des grains d'aleurone qui se colorent en totalité et ne paraissent renfermer aucune inclusion (*fig.* 12, 13, 14, 15, *pl. VIII*).

C'est la substance fondamentale protéique du grain d'aleurone qui fixe énergiquement le colorant vital. En général, la teinte prise est homogène ; cependant, chez l'Orge, il se produit dans la vacuole aleurique un ou plusieurs globules protéiques de précipitation colorés en rouge foncé, alors que le reste de la vacuole garde une teinte rosée.

Ces précipitations ne se voient pas sur les très jeunes germinations, et elles n'apparaissent que lorsque le suc vacuolaire s'est un peu dilué. Il en est de même pour le Blé, et lorsque des globules se précipitent dans la cavité aleurique, celle-ci se décolore presque complètement.

La teinte prise en coloration vitale indique en général l'alcalinité (Blé, Orge, Avoine), mais dans le cas du Maïs, la teinte du rouge neutre est rose et indique plutôt un état neutre ou acide.

En dehors des grains d'aleurone, le cytoplasme paraît renfermer en abondance de petites granulations, peut-être de nature graisseuse. En tous cas, il n'y a aucune trace d'amidon.

Pendant toute la durée de la période germinative, l'assise protéique reste vivante et l'on peut constater au moyen de colorations vitales que son état et celui des grains d'aleurone qu'elle renferme varie peu.

A la fin de cette période, la désorganisation survient très rapidement, mais auparavant les grains d'aleurone se réunissent (Orge) en un petit nombre ou même une seule vacuole qui continue à se colorer vitalement, dans une cellule en voie d'altération et dont le cytoplasme commence à se détacher de la membrane. Le suc vacuolaire prend alors une teinte rose. Il n'y a donc jamais formation de réseau vacuolaire dans l'assise protéique au cours de la germination (*fig.* 24, *pl. VIII*).

ART. 2. — PLANTULES.

L'embryon de la graine renferme de petits grains d'aleurone dans tous ses tissus, mais ceux-ci sont très petits. Au bout de quelques heures de germination, on peut les colorer vitalement, soit dans les jeunes radicules, soit dans les jeunes feuilles de la gemmule, soit dans le scutellum ou cotylédon absorbant.

Radicules. — L'évolution des grains d'aleurone en vacuoles est aisée à suivre dans les jeunes racines. Si l'on observe des radicules très petites qui se sont gonflées seulement dans l'eau, on ne trouve encore, dans leur épiderme (1), que de très petits grains d'aleurone, et il n'existe pas encore de véritables vacuoles. Ces petits grains très nombreux se colorent vitalement en rouge dans les cellules de la coiffe et dans l'épiderme, ce qui indique une réaction neutre ou légèrement acide.

Dans une plantule d'Orge de vingt-quatre heures par exemple, on peut suivre sur une radicule toute la marche de l'évolution des grains d'aleurone en vacuoles. La base de la racine a de grandes vacuoles et les cellules les plus proches de la coiffe renferment de petits granules aleuriques : le passage se fait par des formes de gonflement et d'anastomose. Ces formes en réseau sont surtout remarquables dans le cas du Blé et les filaments vacuolaires très fins, parfois renflés à une extrémité rappellent à s'y méprendre, l'aspect « mitochondrie » (*fig.* 4, 5, 6, *pl. VII*).

Comme dans les cas nombreux déjà vus, ces formes sont en relation avec un métabolisme intense. On peut remarquer qu'elles indiquent une remise en mouvement du cytoplasme très accentuée, qui précède l'hydratation du vacuome. Ce dernier restant visqueux est entraîné par les mouvements et s'étire en filaments et réseaux variés. Plus tard, il s'hydrate très vite et les mouvements du cytoplasme n'ont plus d'influence sur lui.

(1) L'épiderme dont il s'agit, est en réalité l'assise la plus externe de l'écorce.

Feuilles. — Dans les jeunes feuilles de la gemmule, les petits grains d'aleurone se colorent de bonne heure, dans des graines qui ont seulement quelques heures de germination (*fig.* 6 *et* 7, *pl. VIII*). Ce sont de petits grains arrondis, nombreux dans chaque cellule, et qui accusent une réaction basique au rouge neutre. Sur les germinations plus âgées, ces grains d'aleurone se montrent gonflés et il en résulte que par rapprochement, ils se fusionnent peu à peu entre eux et se transforment en un petit nombre de vacuoles plus grandes, puis enfin en une vacuole unique. Il n'y a donc pas en général, formation de réseaux vacuolaires du genre de ceux qu'on observe dans l'épiderme des racines. Le stade réseau est sauté. Cependant dans l'Orge (*fig.* 8, *pl. VIII*), nous avons pu observer sur des plantules ayant quarante-huit heures de germination, des réseaux vacuolaires très fins, colorés par le rouge neutre en une belle teinte rouge brique et dans le Blé de trois jours, des réseaux formés de filaments allongés, disposés autour du noyau et alignés suivant le grand axe de la cellule (*fig.* 12, *pl. VII*).

Voici exposées avec plus de détails quelques-unes des observations vitales que nous avons faites :

A. — Evolution de l'aleurone chez le blé (radicules et feuilles).

Des grains de Blé sont placés trois heures à la température de 22°, sur du buvard humide : on isole ensuite une des radicules en la sectionnant à sa base, et on la place dans une solution de rouge neutre. Au bout de quelque temps ($\frac{1}{2}$ heure environ), l'épiderme est coloré et on peut l'examiner facilement au microscope (*fig.* 2, *pl. VII*). Les cellules ont un cytoplasme très épais au milieu duquel le noyau arrondi se détache en clair. Le rouge neutre est fixé par un très grand nombre de petits grains qui ont pris une couleur rose vif. Leur nombre dépasse certainement la centaine et ils ne montrent aucun déplacement sensible pendant les quelques mi-

nutes que dure l'observation (*fig.* 3, *pl. VII*). Deux ou trois gros globules réfringents dont la nature est inconnue, se montrent également dans les cellules.

Au bout du même temps de germination, les très jeunes feuilles de la gemmule montrent un épiderme colorable vitalement. Leurs cellules renferment de très petits éléments qui prennent une couleur rouge orangé (ils sont par conséquent moins acides que les grains d'aleurone des racines de même âge). Leur forme n'est pas toujours bien facile à apprécier par suite de leur taille très réduite, mais les éléments un peu anguleux paraissent dominer. En dehors du vacuome formé de ces petits grains d'aleurone colorés, il semble que le cytoplasme et le noyau soient constitués par une très fine émulsion (*fig.* 10, *pl. VII*).

Lorsque les jeunes germinations de Blé ont vingt-quatre heures, il y a peu de différence à noter dans l'aspect du vacuome. Dans les radicules, les grains d'aleurone très réfringents sont visibles sans aucun artifice ; après coloration vitale. ils ont une teinte rose vif, un peu violette. Ils sont quelquefois assez gros et gonflés, et comme ils sont sensiblement moins nombreux que dans les stades précédents, il y a eu certainement des fusions de grains d'aleurone ensemble. En tous cas, sur ces très jeunes plantules, il n'y a encore aucune vacuole assez grande, digne de ce nom, dans tout l'épiderme de la radicule. Les cellules de la coiffe ne contiennent aussi, à cette époque, qu'un grand nombre de petits grains d'aleurone isolés, colorés en rose presque violacé.

Dans les jeunes feuilles, on trouve des grains d'aleurone plus gros que ceux qui existaient auparavant dans la graine ; certains d'entre eux même, situés dans les cellules du sommet de la feuille sont assez volumineux, et paraissent contenir un suc assez fluide, pour être considérés comme de petites vacuoles. Ceux qui sont situés dans les éléments de la base des feuilles sont noyés dans un cytoplasme épais et très granuleux ; ils peuvent être assez déformés, pour prendre parfois

l'apparence de courts filaments arqués, mais on n'observe aucun réseau produit par la réunion de plusieurs grains entre eux.

Nous avons examiné un assez grand nombre de ces jeunes feuilles, ce qui était nécessaire, étant donné que la gemmule est déjà formée de feuilles de tailles très différentes les unes des autres ; l'épiderme se montre toujours très perméable et la coloration vitale se fait vite et bien. Dans aucun cas, nous n'avons pu constater de réseaux vacuolaires ou de grandes vacuoles, même au sommet des feuilles.

Jeunes plants de Blé de 48 *heures à* 22°. — Les changements survenus pendant la deuxième période de vingt-quatre heures sont considérables. La racine principale peut atteindre un centimètre de longueur, et les autres radicules se sont beaucoup accrues, elles aussi. Les cellules les plus éloignées de la pointe de la racine sont les éléments les plus âgés ; leur vacuome provient au cours des divisions successives de celui des cellules de la graine ; il est à l'état de grandes vacuoles normales se colorant en rose par le rouge neutre. Ces vacuoles résultent du gonflement et de la fusion entre elles des vacuoles aleuriques déjà indiquées sur les plantules de vingt-quatre heures (*fig.* 9 *et* 10, *pl. VII*).

A la pointe de la racine, les cellules sont beaucoup plus petites, peu allongées ; leur vacuome provient également sans aucun doute, de celui des cellules de la graine, mais il s'est conservé dans ce méristème terminal, dans un état réduit de granules et de filaments, analogue à celui qui existait dans la graine. Les initiales qui forment ce méristème sont disposées en trois groupes dont l'un produit la coiffe, l'autre l'épiderme et l'écorce, le troisième le cylindre central.

On constate dans les éléments découpés par ces initiales, une évolution du vacuome d'autant plus accentuée, que les cellules sont plus éloignées du centre de croissance et sont par conséquent plus âgées.

Les cellules de la coiffe sont produites en grand nombre, et les plus âgées se détachent constamment à la périphérie. Les plus jeunes ont encore de nombreuses petites vacuoles rondes isolées, mais plus tard ces vacuoles se présentent à l'état d'anastomoses, puis elles confluent finalement en une seule grosse vacuole qui refoule le noyau sur le côté. C'est à cet état que les cellules s'exfolient naturellement (*fig.* 14, *pl. VII*).

L'épiderme est d'abord constitué par de petites cellules courtes, dont le vacuome est formé de grains séparés. Pour obtenir la coloration vitale et faire l'observation de ces très jeunes cellules d'épiderme, il faut avoir soin d'enlever, en frottant l'extrémité de la racine entre les doigts, les cellules de la coiffe qui sont peu adhérentes. Il reste alors une zone assez courte, conique, occupée par les cellules de coiffe qui sont trop intimement soudées entre elles pour être détachées par ce procédé, et on dégage ainsi une petite étendue d'épiderme jeune qui serait autrement recouvert par une partie des tissus de la coiffe. Les cellules les plus jeunes de l'épiderme ainsi dévoilé ne sont pas séparées des initiales dont elles proviennent de plus de quatre ou cinq épaisseurs de cellules. Leur état vacuolaire est donc, à peu de choses près, celui des initiales elles-mêmes (1).

Leur vacuome est à l'état de petits granules irréguliers ou de petis filaments qui se colorent en rose vif (*fig.* 3, *pl. VII*). Un peu plus loin de la coiffe, mais toujours dans la zone avoisinante, des formes de filaments très longuement étirés deviennent fréquentes, ainsi que des réseaux d'une délicatesse extrême, dont l'ensemble entoure le noyau comme d'une corbeille délicatement treillagée (*fig.* 4 *et* 5, *pl. VII*). Les filaments par leur taille et leur disposition, ont les plus grandes ressemblances avec des « mitochondries » (2), mais leur ori-

(1) On peut d'ailleurs par un autre procédé, celui des coupes, obtenir une coloration vitale des initiales elles-mêmes.

(2) D'autant plus que la substance qui les forme, très réfringente, est très visible sans aucun artifice de préparation. C'est un exemple de plus démontrant la réalité des faits observés en coloration vitale.

gine, de même que leur destinée ultérieure, montre qu'il ne s'agit là que d'un phénomène de convergence. Très rapidement, en effet, ces réseaux se gonflent, se fusionnent, se disloquent au gré des mouvements du cytoplasme, puis leur ensemble affecte bientôt l'apparence de deux grosses masses vacuolaires réunies autour du noyau central par des trabécules allongés et sinueux. Toute cette évolution se fait dans une région de quelques millimètres située au-dessus de la coiffe et plus haut, il n'y a plus que des cellules dont la grande vacuole unique se colore uniformément en rose et qui représentent l'état normal des cellules végétales adultes. En même temps que ces transformations de l'appareil vacuolaire se produisent, les plastes qui devaient être à l'état de petits granules dans les plus jeunes cellules, se muent en petits amyloplastes composés. Les microsomes, comme d'ordinaire, restent invariables pendant ce temps.

Dans les jeunes feuilles, les phénomènes se passent à peu près de la même façon que dans les radicules, mais l'évolution se présente d'une façon moins schématique. L'épiderme des jeunes feuilles absorbe très bien par toute sa surface très perméable, et le rouge neutre donne une teinte orangée au vacuome. A la base, se trouvent des corpuscules d'assez petite taille, généralement arrondis ; au sommet, les éléments vacuolaires sont plus fluides, plus larges et accolés les uns aux autres. Sur des germinations plus avancées, la substance vacuolaire encore ductile, forme fréquemment des masses mamelonnées, placées aux extrémités de la cellule et réunies dans la région nucléaire par des trabécules irréguliers. Il suffit ensuite de la rupture et de la disparition des trabécules puis de la liquéfaction du vacuome pour obtenir l'état adulte (*fig.* 12, *pl. VII*).

B. — **Evolution de l'aleurone chez l'orge.**

Nous avons essayé les colorations vitales sur des graines

qui avaient été placées trois heures dans l'eau à la température de 22°. Comme dans le Blé, on peut obtenir dès ce moment la coloration des petits grains d'aleurone de l'épiderme ; il suffit pour cela d'isoler une des petites radicules, de la sectionner à sa base et de l'immerger dans une solution du colorant vital (rouge neutre de préférence). On constate que les petits grains d'aleurone qui sont au nombre de 50 à 100 par cellule, se colorent en rose vif ; leur forme est arrondie ou un peu anguleuse. Il n'y a encore ni vacuole ni réseau vacuolaire dans l'épiderme (*fig. 3, pl. VIII*).

Dans l'Orge qui a germé pendant vingt-quatre heures, le vacuome se colore plus facilement et toujours en rouge. A la base de la radicule, il y a de grandes vacuoles et dans la région intermédiaire jusqu'à la coiffe, l'épiderme renferme des granulations ou des filaments vacuolaires à divers états, mais pas de réseaux.

Dans les jeunes feuilles, à cette époque, le vacuome est assez divers. Il y a des files de petites cellules renfermant de petites vacuoles rondes se colorant en orangé ; elles proviennent du simple gonflement des grains d'aleurone de l'embryon ; d'autres cellules situées à la base ou vers le milieu du limbe ont un vacuome finement réticulé, également alcalin. Enfin, les grandes cellules du sommet du limbe, ont de grandes vacuoles se colorant d'une façon homogène en rouge orangé ; plusieurs de ces grandes vacuoles ont tendance à devenir acides.

Dans les plantules qui ont germé 48 heures, on observe facilement après coloration vitale de l'épiderme des radicules, l'évolution vacuolaire à partir du méristème terminal. Les cellules les plus voisines de ce méristème, c'est-à-dire les plus proches de l'extrémité de la radicule, ont leur substance vacuolaire sous forme de petits filaments ou de granules. Il ne se produit pas de réseaux à proprement parler, et quand il y en a, ils n'ont pas la délicatesse de ceux que nous avons signalés dans le Blé, mais il y a souvent des figures filamenteuses variées. Le passage aux grandes vacuoles se fait par gonfle-

ment et réunion progressive des éléments du vacuome méristématique (*fig.* 4 *et* 5, *pl.* VIII).

C. — **Maïs.**

Sur des plantules ayant germé pendant 48 heures à 22°, la racine commence seulement à faire son apparition au dehors. L'épiderme fixe le rouge neutre dans de bonnes conditions. Les cellules les plus proches de la coiffe, renferment de petits grains d'aleurone colorés en rouge vif et assez peu nombreux (20 ou 30 par cellule); les plus gros ont souvent un inclusion claire, incolore. L'évolution en vacuoles s'opère sur quelques millimètres de longueur et la transformation a lieu par hydratation et fusion progressive des vacuoles.

D. — **Avoine.**

Le vacuome évolue de la même façon que dans le Maïs. Lorsqu'on observe des cellules très près du point de végétation, on y remarque de petites vacuoles filamenteuses ou un peu réticulées ; leur substance paraît être épaisse et demi-fluide. Le gonflement et la transformation de ces éléments en grandes vacuoles se fait rapidement, et s'effectue déjà à un millimètre du sommet.

Coupes de radicules.

Nous avons essayé des colorations vitales sur des coupes longitudinales de radicules appartenant à de très jeunes plantules. Nous avons réussi réussi par ce procédé à colorer absolument toutes les cellules ; les initiales elles-mêmes et les divers tissus qui en dérivent, fixent très vite le colorant. Il faut noter une particularité intéressante que révèle cette méthode, lorsqu'on emploie le rouge neutre ; il y a une différence de teinte très nette, après coloration vitale, entre le méristème vasculaire, qui se colore en orangé ou en brun et les autres parties du point de végétation (écorce, moelle, coiffe)

qui se colorent en rose. Cette différence est due, comme nous le savons, à une différence de réaction. Le méristème vasculaire est légèrement alcalin, tandis que les autres tissus ont des vacuoles neutres ou un peu acides.

Dans tous les cas, les grains d'aleurone qui existaient dans toutes les cellules de l'embryon se transforment en vacuoles au moment de la germination. Cette évolution a lieu presque partout par gonflement et mise en contact des vacuoles rapprochées les unes des autres. Dans l'endoderme cependant, et dans le méristème vasculaire, il se forme des réseaux vacuolaires qui peuvent être très allongés. (Maïs, Blé) ; il en est de même dans les cellules de la coiffe (Blé de 48 heures).

E. — **Vacuome du Scutellum.**

Le scutellum ou cotylédon absorbant des Graminées, est un organe élargi en forme de bouclier, qui s'appuie par sa face interne sur l'albumen. Son rôle absorbant n'est pas douteux, car c'est par sa surface que passent les sucs provenant de la digestion des réserves amylacées.

Comme on pouvait le prévoir, le cotylédon absorbe facilement une solution d'un colorant vital. Pour réaliser cette expérience, on place un embryon de Blé ou d'Orge isolé de l'albumen (cette opération peut se faire après 24 heures de germination), dans un bain colorant de rouge neutre ou de bleu de crésyl. Dans ces conditions, très rapidement, la face interne du scutellum se colore en rose par suite de l'absorption du colorant et de sa fixation sur les éléments du vacuome de l'épiderme cotylédonnaire. Il ne reste plus alors qu'à observer les cellules colorées et pour cela, il faudra faire la plupart du temps une coupe transversale du scutellum, car les cellules de l'épiderme interne sont très allongées perpendiculairement à la surface, et si on les observait de champ, on n'aurait qu'une idée très imparfaite de leur structure. Ces cellules peuvent atteindre une longueur de sept ou huit fois

leur largeur dans l'Orge et elles ne sont pas toutes de même longueur, bien que leurs bases soient au même niveau ; il en résulte que certains éléments dépassent les autres, et que la surface absorbante est multipliée dans une grande proportion. Une autre cause vient augmenter encore l'étendue de l'épiderme absorbant, c'est la disjonction qui se produit dans la partie proximale des cellules qui se trouve ainsi isolée et fonctionne comme un poil ou une papille absorbante.

Les grains d'aleurone du scutellum ont une existence éphémère, et on ne peut les observer que sur des plantules très jeunes (Orge, de 24 heures par exemple), et encore les trouve-t-on déjà transformés et fusionnés partiellement en vacuoles (*fig.* 16, *pl. VIII*). Dans tous les stades ultérieurs et sur toutes les plantules examinées, nous avons observé des réseaux vacuolaires ayant un contenu à réaction basique, se colorant en rouge orangé par le rouge neutre (*fig.* 17, 18, 23, *pl. VIII*).

TROISIÈME PARTIE.

Recherches sur le Pollen.

Nous avons vu par l'étude des méristèmes, et par l'examen des diverses parties d'une graine que, dans aucun cas, on ne rencontrait de cellules à cytoplasme plein dépourvu de système vacuolaire. Même dans les graines où les conditions de dessèchement sont les plus grandes, on trouve sinon de véritables vacuoles, du moins des *vacuoles en puissance*, résidu d'un système qui s'est concrété pendant la maturation, en même temps qu'ébauche des futurs réservoirs vacuolaires des cellules de la plantule. Ce sont les grains d'aleurone qui doivent leurs caractères si particuliers à cet état transitoire de dessèchement des cellules de la graine. En somme, le système vacuolaire se propage de cellule en cellule à partir de lui-même : on n'assiste jamais à sa disparition ni à sa naissance ; c'est un élément constant de la cellule.

Pour compléter l'ensemble des preuves en faveur de la permanence du système vacuolaire, il faudrait montrer que dans les gamètes, il existe des vacuoles qui, se mélangeant au moment de la fécondation, assurent la continuité de la substance vacuolaire.

Nous avons commencé par rechercher les vacuoles dans les grains de pollen, où nous pensions qu'elles devaient se trouver dans un état particulier dû à des conditions de déshydratation très intense, et nous avons réussi à les mettre en évidence, par la même méthode des colorations vitales employée ailleurs.

Le pollen des Gymnospermes a déjà donné lieu à de nombreux travaux. Parmi ceux-ci les principaux sont ceux de MM. Strasbürger, Guignard, Miyake, Juranyi.

On a surtout étudié le mécanisme des divisions réductrices et les phénomènes cytologiques de la germination du tube pollinique et de la fécondation. Bien peu de travaux portent sur la constitution du cytoplasme et sur ses inclusions. M. Guignard signale des grains d'amidon dans le pollen des Cycadées, MM. Coulter et Chamberlain dans les tubes polliniques de *Pinus Laricio*, Noren dans le pollen de *Saxegothea conspicua*, Lopriore chez *Araucaria Bidwilli*.

Les vacuoles sont signalées de temps en temps dans les grains de pollen et dans les tubes polliniques, mais sans qu'elles reçoivent une mention spéciale et d'autre part beaucoup de grains de pollen sont figurés par les auteurs comme ayant un cytoplasme plein sans vacuoles.

Aucune recherche par des méthodes mitochondriales n'a été entreprise sur le pollen des Gymnospermes : c'est dire qu'on n'a pas utilisé pour le pollen les fixateurs cytoplasmiques.

Des colorations vitales de grains de pollen n'ont pas encore été réalisées ; les résultats de nos recherches dans cette voie sont donc entièrement nouveaux.

NOTE SUR LA TECHNIQUE EMPLOYÉE.

L'observation des grains de pollen de Gymnospermes est généralement possible en les plaçant directement dans l'eau sans précautions spéciales.

Un certain nombre de grains sont cependant détruits dans ces conditions et le phénomène peut se produire de deux façons : ou bien l'arrivée de l'eau détermine un gonflement brusque du grain de pollen et la rupture non seulement de la coque inextensible, mais aussi de la paroi cytoplastimique interne et la cellule meurt aussitôt; ou bien la coque cutinisée résiste à la pression interne développée et le cytoplasme se

trouve aplati et écrasé par suite du gonflement de la couche interne de l'exine qui ne peut se dilater que vers l'intérieur.

A côté des grains de pollen qui subissent ces accidents, il en demeure toujours un grand nombre chez lesquels l'arrivée de l'eau n'a provoqué aucun dommage. Chez la plupart, la coque s'est brisée assez brusquement, mais sans occasionner de rupture des cellules polliniques, qui demeurent intactes ; chez d'autres plus rares, la coque ne s'est pas rompue et les cellules ont résisté à la pression sans paraître en être incommodées (1).

Chez ces grains de pollen restés vivants dans l'eau, il est possible d'observer des colorations vitales très belles si l'on a pris soin d'ajouter un peu de rouge neutre à la solution. On peut également noter la situation des plastes amylifères et des microsomes.

ART. 1. — BIOTA ORIENTALIS.

Le pollen étudié provenait d'un arbre de l'Ecole de Botanique du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris. Le pollen s'est trouvé mûr au mois de février et j'ai pu facilement à ce moment obtenir une coloration vitale au moyen du rouge neutre.

Si la solution du colorant vital est faite dans l'eau, on constate au bout de quelque temps que les grains de pollen qui ont été placés sous la lamelle éclatent : la partie externe de la membrane du grain, ou *exine*, se brise et les cellules polliniques entourées par la couche interne de l'exine et par l'intine se trouvent mises en liberté dans l'eau. Le mouvement de rupture a lieu par suite du gonflement de la membrane gélatineuse interne (partie non cutinisée de l'exine), ce qui provoque l'éclatement brusque de la coque inextensible.

Après ce phénomène, au bout de quelques minutes, l'intine a été traversée par le colorant et il se produit une fixation du

(1) On reconnaît que les cellules de pollen sont restées vivantes et normales, d'abord par l'examen direct qui ne révèle aucune floculation ni dans le cytoplasme, ni dans le noyau, puis par la possibilité des colorations vitales.

rouge neutre sur les vacuoles des cellules du pollen (*Fig.* 9, *pl. IX*). L'une de celles-ci est beaucoup plus grande que l'autre et contient un gros noyau central : c'est la cellule végétative. Elle est destinée à produire le tube pollinique, aussi l'appelle-t-on encore cellule du tube (tube-cell). La petite cellule est séparée de l'autre par une membrane mince, un peu concave et sa forme est celle d'une hémisphère : c'est la cellule générative, elle contient également un petit noyau arrondi et placé en son centre. Cette cellule produira plus tard après une première division, deux anthérozoïdes.

Dans le cytoplasme de la cellule végétative, se remarquent quelques granulations : les plus grosses sont des grains d'amidon, les plus petites correspondent sans doute aux microsomes.

On constate à ce sujet, d'assez grandes variations dans les grains de pollen : Quelques-uns contiennent une grande quantité d'amidon en très gros grains disposés autour du noyau et d'autres ne renferment que de très petites plastes à amidon, arrondis ou anguleux. Les microsomes sont petits et sphériques ; ils sont répartis à la périphérie de la cellule, les mêmes éléments existent dans la petite cellule, mais sont beaucoup moins nombreux (*fig.* 10 *et* 11, *pl. IX*).

Après coloration vitale, on met en évidence le vacuome : celui-ci est constitué dans la celule végétative d'un assez grand nombre (50 et plus) de vacuoles arrondies à peu près toutes de même taille, qui prennent avec le rouge neutre une coloration rose. Les vacuoles sont toujours indépendantes les unes des autres et ne sont jamais fusionnées entre elles. Le suc vacuolaire est probablement neutre ou légèrement acide.

Lorsqu'on a réussi une coloration vitale, on constate que les éléments du cytoplasme sont disposés assez nettement en trois zones autour du noyau : zone des plastes amylifères au centre, zone des vacuoles dans la région moyenne, zone des microsomes à la périphérie.

La coloration vitale se fait moins vite et moins facilement dans la petite cellule générative que dans la cellule végétative,

ce qui peut être dû, soit à une imperméabilité relative de la membrane, soit à une nature différente du suc vacuolaire. La coloration de cette petite cellule a toujours lieu après celle de la grande cellule, ce qui semble prouver que le colorant n'y pénètre qu'à travers la cloison mitoyenne.

Les vacuoles de la petite cellule sont de taille réduite. Elles peuvent se présenter sous plusieurs aspects différents suivant l'état de mouvement du cytoplasme : ou bien elles sont arrondies et séparées les unes des autres, ce qui est le cas le plus fréquent, ou bien elles ont conflué en un réseau vacuolaire unique qui peut-être très fin et très délié. Cet appareil vacuolaire montre avec le rouge neutre une réaction nettement plus alcaline que le suc des vacuoles de la grande cellule : en effet, la teinte prise en coloration vitale est généralement orangée ou rouge brique, et la différence de réaction est assez marquée avec la cellule végétative. Ce réseau de vacuoles est situé dans le cytoplasme et entoure le noyau de la cellule : on remarque également quelques granulations dont nous avons déjà fait mention et qui correspondent à des plastes amylifères et à des microsomes (*fig.* 10 *et* 11, *pl. IX*).

ART. 2. — *CUPRESSUS LAWSONIA*

Le pollen a été prélevé à diverses époques sur le même arbre du Jardin des Plantes de Paris.

Le 20 mars. — Les grains de pollen s'isolent facilement, ils sont arrondis et leur coque se gonfle dans l'eau. A l'intérieur de leur membrane, on distingue deux cellules, une grande et une petite qui est de forme lenticulaire et dont la cloison mitoyenne est fortement bombée. Nous n'obtenons pas de coloration vitale nette avec le rouge neutre.

Le 29 mars. — Les grains de pollen placés dans la solution du colorant vital, éclatent par suite du même phénomène constaté déjà chez le *Biota*. Les deux cellules qui les composent se trouvent alors libérées de leur coque dure (partie cuti-

nisée de l'exine) mais demeurent enveloppées par la couche interne de l'exine démesurément gonflée (*fig.* 12, *pl. IX*).

Le rouge neutre pénètre et colore des vacuoles rondes, nombreuses, dans le cytoplasme de la cellule végétative : ces vacuoles sont acides (coloration rose).

Dans la petite cellule, le colorant pénètre moins vite ; on y observe quelquefois de très petites vacuoles alcalines, rondes, de coloration orangée, mais le plus souvent tout l'appareil vacuolaire forme un réseau très fin qui entoure le noyau et dont les dipositions sont très variées (*fig.* 12, 13, 14, *pl. IX*).

Comme dans le *Biota*, les cellules du pollen renferment de l'amidon porté sur des plastes et il y a des microsomes très petits répartis en nombre assez élevé au sein du cytoplasme.

ART. 3. — TAXUS BACCATA.

Le pollen au mois de novembre est formé de grains qui sont déjà isolés dans les sacs polliniques. Il existe à ce moment une membrane mince, un assez gros noyau et de nombreuses granulations dans le cytoplasme. Malgré plusieurs essais nous ne pouvons pas réussir de coloration vitale à cette époque.

Au mois de janvier (le 17), nous observons à nouveau des grains de pollen d'If : les grains possèdent alors une coque, mais l'essai de coloration vitale effectué dans une solution de rouge neutre ne provoque pas la rupture de l'exine et il n'est pas possible d'obtenir une coloration.

Le 14 février. — Un nouvel essai de coloration vitale est tenté ; déjà sans aucun artifice, dans une préparation montée dans l'eau, on observe de grandes vacuoles claires dans le grain de pollen. Après l'action de l'eau iodo-iodurée, on distingue très bien le noyau nucléolé, le cytoplasme qui renferme d'assez nombreux grains d'amidon et la vacuole qui est restée incolore et présente la forme d'une hémisphère déformée.

On peut effectuer à cette époque une très bonne coloration au rouge neutre. Le suc vacuolaire est probablement acide, car,

il donne au colorant une teinte rose, un peu violette. Il y a généralement une très grande vacuole ou bien deux ou trois vacuoles de moyenne taille. Parmi les granulations du cytoplasme, on reconnaît des plastes à amidon qui peuvent être assez gros et des microsomes. La coque du grain de pollen demeure intacte pendant le séjour dans l'eau (*fig.* 1, *pl. IX*) ; ceci tient sans doute à ce que la pression développée à l'intérieur du grain n'est pas suffisante pour provoquer la rupture.

Pollen du 25 février. — Le rouge neutre est pris très vite et très bien sans qu'il y ait d'éclatement de la coque du grain de pollen causé par le séjour dans l'eau. Il existe de grandes vacuoles comme dans les grains observés précédemment et qui sont plus éloignés de la maturation. Mais il y a aussi une tendance très nette dans beaucoup de cas à un morcellement de vacuoles. Dans certains même, on trouve de nombreuses petites vacuoles rondes isolées et des stades intermédiaires existent qui font assister à la fragmentation de la grande vacuole primitive. Les vacuoles sont encore acides (teinte presque violette du rouge neutre) (*fig.* 2, *pl. IX*).

Le bleu de crésyl essayé dans les mêmes conditions, pénètre tout aussi facilement : il donne une coloration presque verdâtre à la vacuole ce qui est aussi un témoignage d'acidité.

On observe de l'amidon comme dans les stades antérieurs.

Maturation du grain de pollen. — La maturation se produit très rapidement, par temps sec, à partir du stade précédent. Le pédicelle du bourgeon mâle s'accroît très vite, puis les sacs polliniques fermés jusque là, s'ouvrent et mettent le pollen en liberté.

Deux phénomènes essentiels se produisent à l'époque de la maturation dans le grain de pollen. D'une part, le morcellement de l'appareil vacuolaire qui passe en quelques jours de l'état « grande vacuole » à l'état de très petites sphérules indépendantes dans le cytoplasme ; d'autre part la disparition de l'amidon, très abondant avant la maturation et dont il ne

persiste plus trace dans le pollen mûr. Cette assimilation rapide de l'amidon au moment de la maturation est assez curieuse à constater, car ce n'est pas un phénomène habituel ; il semblerait plus naturel que la réserve d'amidon persistât dans le grain de pollen mûr de façon à être utilisée plus tard pendant la germination.

Lorsqu'on place du pollen mûr dans une solution faible de rouge neutre dans l'eau, il se produit rapidement une pénétration du colorant à travers la coque du grain et la couche interne mucilagineuse de l'exine se colore bientôt en jaune, puis le rouge pénètre dans le cytoplasme et vient se fixer sur de nombreuses petites vacuoles rondes qui prennent une teinte rosée. Souvent la teinte du vacuome est orangée, ce qui indique une réaction basique et l'on remarque que plus le pollen est mûr et sec plus la nature du vacuome a tendance à être alcaline.

Au bout de quelques minutes, le gonflement très considérable de la membrane provoque généralement l'éclatement de la couche externe dure et inextensible (couche cutinisée de l'exine) et la cellule pollinique se trouve libre dans l'eau entourée par une épaisse paroi mucilagineuse (*fig.* 4, *pl. IX*).

Si la coloration vitale est très bien réussie et si le pollen est bien mûr, on observe dans le cytoplasme une grande quantité de petites sphérules orangées (il est difficile de les compter, mais leur nombre paraît dépasser la centaine) et un gros noyau nucléolé au centre du grain. Dans les cas favorables, nous avons noté qu'il y avait des inclusions incolores dans les sphérules vacuolaires, ce qui justifierait une comparaison avec les grains d'aleurone.

Cette évolution des vacuoles à la maturation est évidemment sous la dépendance de la perte d'eau qui se produit à cette époque. Cette déshydratation explique le morcellement de la vacuole, la concentration du suc des petites sphérules et le dépôt d'un corpuscule à l'intérieur de certaines d'entre elles.

Le grain de pollen avant maturation renfermait de gros grains d'amidon : très rapidement celui-ci disparaît. Dans le pollen du bourgeon ouvert, il n'y a plus traces d'amidon et accru, mais qui n'est pas ouvert, il en reste encore quelques traces (très petits grains se colorant en gris pâle). Dans le pollen du bourgeon ouvert, il n'y a plus traces d'amidon et le grain de pollen placé dans l'eau iodo-iodurée prend une teinte jaune uniforme.

Les faits cytologiques importants de la maturation du grain de pollen chez l'If sont donc : l'accroissement du cytoplasme, le morcellement des vacuoles et le changement de réaction du suc vacuolaire qui devient alcalin, puis la disparition concomitante de l'amidon qui est consommé.

ART. 4. — CEPHALOTAXUS FORTUNEI.

Le pollen a été prélevé à diverses époques sur un arbre de l'Ecole de Botanique.

Le 7 mars. — Nous faisons un examen dans l'eau des grains de pollen isolés par écrasement des sacs polliniques de façon à nous rendre compte de leur état d'évolution. Les grains sont au stade de *tétrades* ou bien disposés par deux ; enfin quelques-uns sont isolés. Il existe à ce moment beaucoup d'amidon et le noyau nettement visible est granuleux. Dans quelques cas une grande vacuole incolore est reconnaissable ; elle est en forme de croissant. On constate que les vacuoles ne se colorent pas par le rouge neutre.

Le 4 avril. — Les grains de pollen s'isolent facilement dans l'eau après écrasement des sacs polliniques. On rencontre souvent à cette époque des grains de pollen isolés, unicellulaires et encore quelques rares tétrades. L'amidon est très abondant, en grains très gros et assez nombreux, disposés dans le cytoplasme autour du noyau qui est bien visible, arrondi et granuleux. Les grains d'amidon sont simples ou composés et ils sont très nets grâce à leur réfringence spéciale.

Le grain de pollen est entouré par une membrane assez épaisse au-dessous de laquelle s'observent dans le cytoplasme de nombreux microsomes. Les grains d'amidon sont au contraire groupés autour du noyau. La coloration vitale au rouge neutre réussit bien. On met ainsi en évidence de grosses sphères vacuolaires indépendantes qui se teignent en rose par le rouge neutre (*fig.* 5, *pl. IX*).

Le 1er mai. — Nous observons une division de grains de pollen au stade de la métaphase dans le grain coloré vitalement par le rouge neutre : le système vacuolaire se trouve à l'état de petites sphérules colorées en rose. Les chromosomes sont incolores, mais ils sont bien visibles comme des bâtonnets plus réfringents que le reste du cytoplasme. L'ensemble du noyau en division n'est pas central, mais situé vers l'un des pôles de la cellule où se formera plus tard une petite cellule (cellule générative) (*fig.* 6, *pl. IX*).

A cette époque on observe des stades de grains bicellulaires très nombreux. Le séjour dans l'eau détermine rapidement comme chez le *Taxus*, l'éclatement de la coque cutinisée et il devient facile d'observer le contenu des cellules du pollen car elles sont très transparentes. Leur ensemble est allongé et de forme ovoïde ; il comprend une grande cellule végétative et une petite cellule générative située du côté du petit bout de l'ovoïde et qui a une forme hémisphérique (1) (*Fig.* 7, *pl. IX*).

Lorsqu'on a essayé la coloration vitale, on constate que la petite cellule est plus lente à se colorer que la grande ; il faut ordinairement une demi-heure ou une heure pour obtenir un résultat et la teinte prise est toujours différente de celle de la grande cellule. Cette dernière renferme un noyau central nucléolé et dans son cytoplasme s'observent de très nombreuses vacuoles roses ; des grains d'amidon réfringents sont visibles autour du noyau.

(1) Comme chez les Cupressinées, la cellule générative donne naissance, après une première division en cellule pédicelle et cellule anthéridiale, à deux anthérozoïdes. Ces divisions n'ont lieu qu'un an après la pollinisation.

Le colorant qui a pénétré dans la cellule végétative passe ensuite à travers la membrane mitoyenne et vient se fixer sur le vacuome de la cellule reproductrice. Ce vacuome peut se présenter sous plusieurs aspects différents : ou bien on le trouve constitué par un certain nombre de petites vacuoles sphériques et alcalines (coloration orangée) ou bien c'est un réseau vacuolaire orangé dont la forme est très irrégulière et d'ailleurs changeante. Dans une observation de l'un de ces réseaux, nous avons dessiné trois dispositions successives qui se sont sucédées dans l'espace d'une minute. Cet état du vacuome ne peut guère se comprendre, sans admettre qu'il est formé d'une substance visqueuse ; lorsque la quantité de matière vacuolaire est moindre, on peut observer de réseaux excessivement fins, mais qui se détachent toujours avec une netteté parfaite sur le fond incolore.

Il existe également dans la cellule générative de petits grains d'amidon autour du noyau (*fig. 7 et* 8, *pl. IX*).

Nous avons fait l'essai de quelques autres colorants vitaux dont les résultats ont été notés. Avec du pollen presque mûr, le bleu de crésyl, si la concentration du colorant est faible, ne donne aucune coloration; si au contraire la concentration est forte, la pénétration s'effectue : dans la cellule végétative, les grosses sphérules se teignent en bleu vert ; dans la petite cellule générative, les vacuoles se teignent en violet métachromatique assez foncé.

Le bleu de méhylène n'a donné aucune résultat ; le bleu du Nil réussit au contraire et colore les vacuoles de la grande cellule en bleu vert, mais l'on ne parvient pas à colorer la petite cellule reproductrice.

ART. 5. — GINGKO BILOBA.

Le pollen a été étudié sur un arbre planté dans le Jardin des Plantes à Paris.

Les divisions de maturation se produisent au début de

mois d'avril. A cette époque, nous n'avons pas réussi de colorations vitales des vacuoles ; mais l'on obtient par contre la fixation du rouge neutre sur les chromosomes du noyau (Voir les indications à ce sujet dans le chapitre spécial concernant les colorations vitales).

Vers le milieu d'avril, le grain de pollen isolé dans le liquide nutritif du suc, montre la structure suivante : il existe un seul noyau souvent placé sur le côté et une vacuole très grosse se distingue facilement; enfin une réserve assez abondante de gros grains d'amidon se trouve dans le cytoplasme. Le vacuome à ce stade ne fixe pas le rouge neutre et nous n'avons pas pu obtenir de coloration vitale.

Au mois de mai, se produit la maturation du pollen. Les étamines de *Gingko* qui étaient vertes précédemment commencent à jaunir. Le pollen se montre cloisonné et comprend à maturité quatre cellules, une grande qui est la cellule végétative et trois autres cellules aplaties dont la première est la cellule générative tandis que les deux dernières sont des cellules prothalliennes.

A ce moment, on obtient une coloration vitale dans ces éléments. Dans la cellule végétative, il y a de nombreux sphérules vacuolaires se teignant en rose par le rouge neutre. Dans les petites cellules, on voit des granulations du vacuome colorées en rouge (1) (*fig.* 17, *pl. IX*).

Il n'existe pas de différence de réaction entre le suc vacuolaire de toutes ces cellules.

ART. 6. — ETUDE DU POLLEN DES GYMNOSPERMES APRÈS FIXATION (MÉTHODE DE REGAUD).

Nous avons vu qu'il était possible de reconnaître et de distinguer dans les grains de pollen examinés vivants, la plupart des éléments constitutifs du cytoplasme. Cependant, la pré-

(1) La dernière cellule prothallienne est très aplatie et ne possède pas de contenu discernable.

sence des plastes dans le pollen est surtout révélée par la présence de l'amidon dont ils sont porteurs, si bien que ce n'est pas une simple observation vitale dans ce cas qui permet de se rendre compte de l'existence des plastes ; d'autre part, c'est précisément dans des exemples de grains de pollen ou de germinations incolores que l'on a anciennement parlé d'une naissance de l'amidon directe, au sein du cytoplasme. Pour toutes ces raisons, il était nécessaire d'appliquer aux grains de pollen des Gymnospermes une méthode de fixation et de coloration qui mît en évidence les plastes et qui permît d'affirmer leur existence en toute certitude.

La méthode de Regaud a pu être employée à cet effet, bien qu'elle ne réussisse pas toujours : on sait que les grains de pollen, au voisinage de la maturation ne se prêtent pas aisément à la fixation à cause de la présence d'une membrane fortement cutinisée, de sorte que les résultats obtenus sont assez médiocres.

Pendant le stade de cellules mères et avant les divisions réductrices, il est au contraire plus facile de réussir de bonnes préparations. C'est à cette période qu'ont été colorées des cellules mères du pollen chez le *Gingko biloba* (*pl. IV*, *fig.* 16). On voit qu'à ce moment le vacuome non coloré se trouve à l'état de petites vacuoles claires et on remarque dans le cytoplasme des granulations parmi lesquelles on ne peut faire aucune distinction. Par suite de leur grosseur assez uniforme, il semble qu'il s'agisse uniquement de corpuscules appartenant au plastidome.

Dans la période qui suit de près les divisions réductrices, au moment où les grains de pollen se trouvent réunis par groupes de quatre, en tétrades, nous avons eu de bons résultats dans nos préparations chez le *Cephalotaxus Fortunei*.

Le vacuome non coloré, constitue à ce moment un système de canalicules plus ou moins anastomosés en un réseau. On observe à ce moment une très bonne distinction entre des plastes globuleux et relativement gros et des éléments de taille

beaucoup plus faible, répartis en abondance à l'intérieur du cytoplasme. Ces derniers semblent correspondre aux éléments du sphérome que l'on voit sur le vivant (*Fig.* 17 *et* 19, *Pl.* IV).

Enfin chez *Taxus baccata*, des portions de sacs polliniques ont été fixées au début du mois de février. Les préparations ont été moins satisfaisantes que pour les exemples précédents, en raison de la cutinisation avancée des enveloppes du pollen à cette époque. Elles mettent cependant en évidence d'une façon très nette des plastes, répartis autour du noyau et dans les travées cytoplasmiques et ceux-ci correspondent évidemment par leur taille et leur situation aux corpuscules amylacés du pollen vivant. Les vacuoles assez grandes à ce stade se détachent en clair et l'on ne remarque pas de corpuscules colorés à leur intérieur (*Fig.* 18, *Pl.* IV).

CONCLUSIONS.

Nous rappelons qu'une étude vitale systématique du pollen des Gymnospermes n'a jamais été faite : après comparaison des résultats qu'elle donne, avec ceux que fournit la fixation, elle conduit à un certain nombre de constatations intéressantes. Il y a beaucoup de profit à tirer de recherches de ce genre, car il s'agit de cellules ayant une haute importance, et qui portent en elles toute l'hérédité mâle.

Dans deux notes récentes sur les *Iris*, M. P.-A. Dangeard a déjà montré que le pollen de ces plantes, ainsi que le sac embryonnaire, renferment les éléments habituels aux cellules végétatives, c'est-à-dire des plastes et des microsomes. A ce sujet il s'exprime ainsi : « La distinction du plastidome et du sphérome est donc aussi nette dans le sac embryonnaire que dans le grain de pollen, et cette constatation a un grand

intérêt au point de vue des phénomènes ultérieurs de la fécondation ».

Nous sommes en mesure de confirmer cette conclusion en ce qui concerne le pollen des Gymnospermes : les cellules polliniques sont des cellules complètes renfermant toujours les trois catégories d'éléments distingués par M. P.-A. Dangeard chez l'*Iris*.

Ce sont des vacuoles colorables vitalement, des plastes généralement amylifères et des microsomes.

Bien que les vacuoles correspondent à une partie de la cellule moins vivante que le reste, elles ont dans ce cas des grains de pollen un intérêt indéniable, par suite de la pénurie d'eau et du ralentissement de la vie qui sont l'apanage des éléments du pollen mûr.

Malgré leur état desséché, les grains de pollen contiennent toujours un vacuome à disposition condensée qui fixe les colorants vitaux d'une manière élective.

Cet appareil consiste ordinairement en un ensemble de sphérules indépendantes au milieu du cytoplasme. C'est le cas notamment des cellules végétatives (*Taxus*, *Cupressus*, *Cephalotaxus*, *Biota*, *Gingko*). Il peut aussi se trouver sous le même état dans les cellules génératives, mais le plus souvent, en raison du caractère moins fluide de la substance vacuolaire, il se dispose en un réseau très délié dont la forme varie sous l'influence des mouvements cytoplasmiques qui nous sont ainsi révélés.

Il existe une différence notable entre le vacuome des cellules végétatives et celui des cellules génératives. Dans le premier cas, le suc est neutre ou même légèrement acide ; dans le deuxième cas le suc est alcalin et sa consistance demi-fluide, ce qui entraîne la formation de réseaux.

Ce fait doit être rapproché, toute proportion gardée, des observations de M. Guignard chez le *Lis martagon* où ce savant insiste sur la différence des caractères histochimiques des noyaux et des protoplasmes suivant qu'il s'agit de la cellule

végétative ou de la cellule génératrice. Au moyen d'un mélange approprié de vert de méthyle et de fuschine, il colore en effet en rose vif le protoplasme de la cellule génératrice et le distingue ainsi de celui de la cellule végétative. D'après ce que nous avons constaté, il se produit une spécialisation comparable, en ce qui concerne l'appareil vacuolaire, car les sphérules du vacuome que l'on observe dans le cytoplasme avant bipartition des cellules polliniques, sont toutes semblables d'apparence et leur réaction vis-à-vis du rouge neutre est la même (*fig.* , chez *Cephalotaxus Fortunei*) ; même au moment où s'effectue la division et alors que la cloison n'est pas encore établie, on ne peut pas encore remarquer de différence.

Au contraire dès que la membrane cellulosique s'est formée et qu'elle sépare, les cellules végétatives et génératives, le vacuome, dès lors divisé en deux parties complètement isolées, commence à manifester des différences profondes : dans la cellule végétative, les vacuoles restent arrondies ; leur suc qui paraît assez fluide demeure neutre ou légèrement acide; dans la cellule générative au contraire, le suc vacuolaire s'épaissit et comme les mouvements cytoplasmiques sont intenses, on peut observer fréquemment des dispositions variées et changeantes de filaments et de réseaux. On peut voir ceux-ci se modeler d'une manière excessivement complexe sous l'effet de pressions internes dont elles sont à nos yeux la seule manifestation.

Il y a là un spectacle que seule peut nous donner l'étude vitale : il est plus riche d'enseignement que celui qu'on acquiert après l'examen d'un grand nombre de préparations fixées.

Les grains de pollen renferment certainement un vacuome à tous les états de leur développement. Lorsque le grain est jeune et au moment de la formation des tétrades, il n'a pas été possible, cependant, d'obtenir des colorations vitales d'une manière générale. Chez le *Gingko*, la coloration a

réussi, mais nous avons obtenu une fixation du rouge neutre par les chromosomes du noyau et non par les vacuoles. Ces faits sont encore trop isolés pour que l'on puisse en tirer des conclusions. Retenons qu'à certaines périodes de leur développement les grains de pollen ont un vacuome dépourvu d'affinité pour les colorants vitaux.

Les grains de pollen à ballonnets remplis d'air, des *Abiétinées* (*Pinus*, *Abies*, *Picea*, *Cedrus*), ne se sont pas montrés colorables vitalement par le rouge neutre, de sorte que notre étude ne porte que sur le pollen des *Taxinées*, *Cupressinées et Gingkoales*.

QUATRIÈME PARTIE

Questions relatives aux colorants vitaux

Dans les chapitres précédents, il a été souvent question du virage de teinte qui se produit lorsqu'un colorant vital tel que le bleu de crésyl ou le rouge neutre pénètre dans une vacuole.

Nous avons encore appelé ce virage une *métachromasie* et nous avons cherché quelles pouvaient en être les causes. Par une étude spéciale des éléments dans lesquels se produisait ce phénomène, nous sommes arrivés à l'expliquer ainsi :

Les vacuoles qui prennent en coloration vitale une teinte métachromatique sont des vacuoles à contenu alcalin. Dès que la substance vacuolaire devient neutre ou acide (cas de l'apparition de tannins à son intérieur par exemple), il ne se fait plus de métachromasie.

Il n'est pas douteux qu'il soit intéressant de connaître si une vacuole possède une réaction alcaline ou acide et le physiologiste ne peut pas se passer de cette donnée, car les vacuoles jouent un rôle important dans le fonctionnement de la vie.

On sait, en effet, que la cellule végétale avec ses vacuoles, se comporte comme un véritable asmomètre et que, par elles se trouve réalisée la pénétration ou endosmose des sels solubles du milieu extérieur à l'intérieur des tissus.

On peut dire que grâce à ce mécanisme une partie de la nutrition de la plante se trouve assurée (nutrition minérale).

En réalité, les phénomènes sont moins simples et l'osmose n'est qu'une première approximation de la vérité en matière de physiologie cellulaire. La vacuole fonctionne comme un osmomètre, il est vrai, mais comme un osmomètre à mem-

brane particulière semi-perméable qui ne laisse pénétrer que certains sels parmi tous ceux qui existent dans le milieu extérieur. En outre, si la concentration du milieu dans lequel sont plongées les cellules augmente, il se produit bientôt un nouvel équilibre des tensions osmotiques par suite de la propriété que possède la vacuole d'augmenter rapidement sa teneur en ions et de réaliser ainsi une nouvelle pression osmotique du suc cellulaire.

Pour de Vries, cette propriété très importante des vacuoles était due aux qualités spéciales de la membrane vacuolaire qu'il supposait vivante et désignait du nom de *tonoplaste*. D'après nos recherches, cette membrane n'a pas d'existence réelle et les propriétés spéciales des vacuoles pourraient être dues à la présence d'une substance fondamentale protéique reconnue dans toutes les vacuoles, par M. P.-A. Dangeard, la métachromatine, mais ce n'est là, bien entendu, qu'une hypothèse.

En raison de l'importance des données qui se rapportent aux substances vacuolaires, le moment est venu d'exposer dans un chapitre spécial les résultats de nos recherches sur l'alcalinité et l'acidité des vacuoles, appréciées au moyen de la métachromasie des solutions colorantes.

Après quelques indications générales nécessaires sur le phénomène, et quelques mots d'historique, nous ferons l'exposé de nos recherches personnelles.

CHAPITRE PREMIER

Phénomènes de Métachromasie

Dans la technique des colorations utilisées en histologie, il est assez fréquent de constater un changement de teinte du colorant lorsqu'il est fixé par certains éléments cellulaires. C'est là le phénomène de la métachromasie. On dit alors que la coloration prise est métachromatique ou que la coloration de certains corps de la cellule se fait avec métachromasie.

Chez les végétaux, cette action se constate principalement au contact de granulations, fréquentes dans les cellules des Champignons ou des Algues, et que l'on nomme pour cette raison « corpuscules métachromatiques ».

Chez les animaux, on peut citer des corpuscules ayant les mêmes propriétés dans certains leucocytes (Mastzellen).

Bien que le mot de métachromasie ait été employé surtout pour un phénomène de virage de teinte produit dans des préparations fixées et colorées, on l'a appliqué également au même changement produit en coloration vitale dans des préparations d'objets vivants. Ainsi M. Guilliermond dans ses recherches sur les Levures signale la coloration métachromatique à l'état frais des corpuscules métachromatiques par le bleu de méthylène. M. Langeron signale aussi le virage sur le vivant avec le rouge neutre dans certaines vacuoles.

Nous croyons qu'il est essentiel de faire la distinction entre la métachromasie en coloration vitale et la métachromasie après fixation. Ce sont là deux ordres de faits absolument séparés et qui n'ont entre eux qu'un rapport assez vague,

car des éléments qui se colorent métachromatiquement dans la cellule vivante ne se colorent plus ainsi lorsqu'ils sont fixés et inversement. Ainsi, dans une cellule d'albumen de Ricin, la substance fondamentale du grain d'aleurone se colore vitalement en violet par le bleu de crésyl, tandis que le cristalloïde prend une teinte bleu et que le globoïde demeure incolore. Après fixation, au contraire, le globoïde se tient en violet métachromatique avec le même colorant.

La distinction est donc importante et nous insistons sur la nécessité de la faire, car, en général on parle de métachromasie sans indiquer s'il s'agit de préparations fixées ou d'un examen vital.

Nous laisserons de côté la question de la métachromasie après fixation ; ses causes sont très discutées et il ne semble pas qu'une théorie satisfaisante ait été donnée jusqu'à présent.

Métachromasie dans les colorations vitales

Elle a été très peu mentionnée chez les animaux par les auteurs qui ont employé le rouge neutre comme colorant vital. Ainsi M. Prowazek, ne la signale pas dans ses colorations vitales d'Infusoires.

Elle est reconnue par M. Guilliermond dans les vacuoles des Levures en 1903 ; M. P.-A. Dangeard signale dans tous les Champignons qu'il colore vitalement ; les vacuoles colorées par le bleu de crésyl prennent une teinte rouge violacée ou bien il se précipite à leur intérieur des corpuscules de couleur rouge, métachromatique. Il reconnaît le premier une coloration vitale métachromatique chez les Phanérogames (jeunes bourgeons d'*Asparagus*, etc.).

M. Guilliermond refait les observation vitales de M. P.-A. Dangeard chez les Phanérogames, mais il n'observe pas au début la métachromasie et il met en doute l'opinion de ce dernier. Pour lui, la coloration vitale chez les Phanérogames est due aux composés phénoliques contenus dans les vacuoles et il n'y a pas de rapport à établir avec ce qui se produit chez

les Champignons ; en effet, la coloration vitale produite n'est pas métachromatique comme chez ces derniers.

Nous montrons en 1920, que la réalité d'une coloration vitale métachromatique des vacuoles chez les Phanérogames ne saurait être discutée. Nous l'observons dans les cellules embryonnaires des jeunes bourgeons de Conifères et nous précisons dans quelles cellules elle se produit : elle a lieu dans les cellules jeunes de méristème et nous pensons pouvoir en donner la raison : la coloration métachromatique des vacuoles serait due au contenu neutre ou légèrement alcalin de celles-ci ; au contraire, dans les vacuoles adultes, le contenu vacuolaire étant devenu acide il se fait une coloration vitale sans métachromasie.

Nous retrouvons le même phénomène dû à la même cause, dans le cas de l'évolution de l'aleurone du Pin maritime : les vacuoles qui dérivent des grains d'aleurone ont d'abord un contenu alcalin et se colorent métachromatiquement, ce n'est qu'avec l'apparition des composés phénoliques dans les vacuoles que le contenu vacuolaire devenant acide, la métachromasie cesse.

De même chez le Ricin, la substance fondamentale des grains d'aleurone est métachromatique en coloration vitale ; celle de l'assise protéique des Graminées est dans le même cas. Les jeunes vacuoles des cellules les moins différenciées du Rosier sont également métachromatiques.

Nous avons donc signalé un grand nombre de circonstances où les vacuoles des Phanérogames sont métachromatiques. C'est généralement dans les cellules embryonnaires que l'on trouve des vacuoles ayant ces propriétés, tandis que les vacuoles adultes ont en général un suc acide qui ne produit pas de virage des colorants vitaux.

Ce sont les expériences suivantes qui ont conduit à indiquer la cause de la métachromasie en coloration vitale.

Expériences sur des solutions « in vitro »

Lorsqu'on emploie le rouge neutre comme colorant vital et qu'on le voit teindre la vacuole dans laquelle il pénètre en jaune orangé ou en brun rouge, on peut en déduire que cette vacuole a un contenu alcalin.

En effet, le rouge neutre. est un indicateur coloré d'une extrême sensibilité. Ses solutions dans l'eau distillée sont roses ; or, l'eau distillée du commerce est neutre au tournesol. Si on ajoute quelques gouttes d'acide, la solution conserve sa teinte rose qui devient toutefois légèrement violacée.

Dans l'eau ordinaire (eau de la Ville de Paris) qui est légèrement alcaline, le rouge neutre donne une solution orangée avec faible concentration, rouge brun avec forte concentration.

Si l'on opère avec de l'eau distillée dans laquelle on dissout des quantités croissantes de potasse, on constate que pour obtenir une teinte comparable à celle que donne l'eau de ville, il faut se servir d'une solution au millième. Pour apprécier les teintes, on fait dissoudre une petite quantité de rouge neutre en poudre dans les solutions diverses expérimentées. Inversement pour qu'une solution de rouge neutre dans l'eau de ville reprenne la teinte rose de la solution dans l'eau distillée, il faut ajouter à la solution dans l'eau de ville au moins deux décigrammes d'acide chlorhydrique pur par litre en vue de la neutraliser.

Ces expériences mettent en évidence l'extrême sensibilité du rouge neutre comme indicateur coloré ; nous allons nous en rendre compte d'une façon plus précise en comparant les résultats donnés par les indicateurs usuels.

Hélianthine. — Donne une solution orangée soit avec de l'eau distillée, soit avec l'eau de la Ville. On ne peut remarquer aucune différence de teinte tandis que le rouge neutre accuse très nettement un changement de couleur. Si on ajoute une

goutte d'acide à la solution dans l'eau distillée, il se produit une teinte rose vif.

Phénophtaléine. — Poudre blanche, insoluble dans l'eau ordinaire et dans l'eau distillée. Dans une solution de potasse au millième donne une teinte rose qui se décolore complètement par l'adjonction d'une goutte d'acide. Même résultat avec une solution de carbonate de soude au millième.

Tournesol. — Le tournesol prend une teinte bleue aussi bien dans l'eau distillée que dans l'eau ordinaire. L'eau distillée se montre neutre au tournesol ; l'eau de ville se montre au contraire légèrement alcaline comme on le constate en y plaçant un papier rouge qui bleuit.

Rouge Congo. — Donne une solution orangée soit avec l'eau distillée, soit avec l'eau de ville. On peut cependant remarquer une très légère différence de teinte entre les deux solutions ; celle qui est faite avec l'eau ordinaire étant un peu violette, mais la différence est tout à fait légère (une goutte d'acide produit un virage immédiat au bleu).

Ces comparaisons nous montrent que la sensibilité du rouge neutre est telle qu'il peut indiquer des indices d'alcalinité très faibles, tout juste sensibles au tournesol.

Comme sa teinte varie vers l'alcalinité du rose vers l'orangé et le jaune paille avec passage par toute une série de teintes intermédiaires, il est précieux pour déceler de très faibles changements dans le cas de solutions ayant une minime teneur en acide ou en alcali ; c'est le cas précisément des vacuoles végétales.

Au contraire, si la teneur des solutions de rouge neutre devient riche en alcali, la teinte de la solution passe au jaune paille, puis devient complètement incolore.

Les expériences faites « in vitro » permettent d'interpréter ainsi les résultats des colorations vitales. Il résulte de nos essais au moyen du rouge neutre dans les vacuoles végétales que la teneur de celles-ci en alcali n'atteint jamais la concen-

tration pour laquelle le colorant deviendrait jaune paille ou se décolorerait. Les vacuoles reconnues comme étant les plus basiques correspondent d'après leur teinte à un degré d'alcalinité égalant ou dépassant légèrement celle de l'eau de ville (ce qui correspond, nous l'avons vu, à une solution de potasse au milième).

Lorsqu'au contraire les vacuoles colorées vitalement au rouge neutre apparaissent roses, on peut être certain que leur suc est soit neutre (neutralité de l'eau distillée) soit acide. L'on peut même, lorsque la teinte est rosée, un peu violacée, pronostiquer l'acidité d'une façon certaine avec un peu d'habitude. On voit donc quels services peut rendre le rouge neutre pour la connaissance de la réaction du suc vacuolaire.

Avec ce colorant, nous avons pu établir qu'il y avait des cas nombreux où le vacuome était alcalin, ce qui était mal connu jusqu'à présent ; le degré d'alcalinité peut même être précisé assez exactement.

Il existe en dehors du rouge neutre plusieurs colorants vitaux qui présentent des phénomènes de virage de teinte. Nous avons comparé leur métachromasie à celle du rouge neutre, ce qui nous a permis d'établir que la même explication pouvait être appliquée à certains d'entre eux. La métachromasie est due dans divers cas à des différences de réaction.

Bleu de crésyl. — Ce colorant donne une solution bleue dans l'eau distillée et dans l'eau ordinaire, il en est de même dans une solution acide. Une solution de potasse au centième dans l'eau distillée donne au bleu de crésyl une teinte violacée qui redevient bleue par adjonction d'un acide. Le même virage se produit avec une solution de potasse au millième. Une solution au dix millième par contre ne donne plus aucun virage de teinte appréciable. Une solution de carbonate de soude au centième ne donne pas le virage non plus.

Bleu de Nil. — Donne une solution bleue dans l'eau distillée et dans l'eau de ville. Prend une teinte violette ou rosée en

présence des bases. Une solution de potasse au dix millième dans laquelle on verse quelques gouttes d'une solution de bleu de Nil, dans l'eau distillée, prend une teinte violette ou rose. Ce virage s'observe avec une solution de potasse au vingt millième. Il ne s'en produit pas avec du carbonate de soude au centième.

Bleu de toluidine. — Les solutions de ce colorant dans l'eau distillée sont d'un beau bleu, comparable à la teinte que donne le bleu de crésyl; il en est de même si la poudre colorante est dissoute dans l'eau ordinaire et l'on ne peut pas reconnaître une différence de teinte entre les deux solutions.

Si au contraire, le bleu de toluidine est placé dans une solution de potasse au millième, il donne une teinte violette qui correspond tout à fait à celle que l'on observe dans les cellules colorées métachromatiquement. Il ne donne plus aucun virage et se colore en bleu dans une solution au dix millième ; à cette dose, l'alcalinité est donc trop faible pour produire un effet appréciable.

Nous avons vu plus haut que le degré d'alcalinité de l'eau ordinaire (eau de Paris), correspondait à peu près à une solution de potasse au millième ; cependant l'eau ordinaire ne produit pas de métachromasie tandis que la solution de potasse la montre très nettement. Il faut en déduire que le degré d'alcalinité n'intervient pas seul, mais aussi la nature de l'alcali.

Comme pour le bleu de crésyl, le virage est réversible et la solution violette dans la potasse diluée redevient bleue par adjonction d'un acide.

Bleu de méthylène. — Le bleu de méthylène se conduit d'une façon différente des précédents colorants, car il ne vire pas par l'adjonction d'une faible quantité de base.

Vert Janus. — Les solutions de ce colorant ne changent pas de teinte ni avec la potasse ni avec les acides (acide acétique, sulfurique, critique gallotannique). On obtient seulement une teinte violet pâle avec l'acide azotique.

Conclusions

De l'ensemble des faits observés, soit en coloration vitale, soit « in vitro », il résulte que les teintures vitales peuvent servir à déterminer la nature acide ou alcaline des vacuoles. Le rouge neutre en particulier permet d'atteindre une grande précision. Les phénomènes de métachromasie en coloration vitale correspondent certainement dans la plupart des cas à des virages de teinte produits dans le suc cellulaire lorsqu'il est légèrement alcalin. Ceci est vrai non seulement pour le rouge neutre, mais aussi pour d'autres colorants, tels que le bleu de crésyl, le bleu de Nil, le bleu de toluidine.

Le bleu de méthylène se distingue des précédents en ce qu'il ne vire pas dans les solutions alcalines « in vitro ».

Nous avons cependant observé le virage à l'intérieur des vacuoles alcalines (coloration vitale chez *Taxus baccata*). On ne peut donc faire autrement que d'attribuer la métachromasie du bleu de méthylène en coloration vitale à une propriété particulière encore inconnue des vacuoles alcalines.

Le vert Janus ne présente pas non plus de métachromasie *in vitro* (sauf très léger virage avec l'acide azotique) ; or, ce colorant vital présente parfois une teinte rosée dans les vacuoles où il pénètre. M. P. A. Dangeard a signalé ce fait dans les jeunes pétales de *Geranium* où il observe que le système vacuolaire se colore au moyen du vert Janus et prend « une teinte rose qui passe plus ou moins au vert ».

Nous avons eu l'occasion d'observer des faits analogues qui seront décrits au chapitre suivant.

Les colorations métachromatiques du vert Janus n'ayant pas pu être reproduites « in vitro » dans des conditions satisfaisantes, il en résulte que nous n'avons aucun moyen pour l'instant de savoir quelle est la cause de cette métachromasie.

Comme conclusion, nous retiendrons que certains colorants vitaux, tels que le bleu de méthylène et le vert Janus, peuvent présenter une métachromasie d'un caractère particulier dont

l'explication ne peut être trouvée dans les propriétés acides ou alcalines des vacuoles.

Pour les véritables colorants vacuolaires (rouge neutre, bleu de crésyl, bleu de Nil, bleu de toluidine) la nature de la réaction du suc cellulaire entre en jeu au contraire d'une façon fort nette et la disparition de la métachromasie qui se produit à un moment donné de l'évolution cellulaire, permet de noter le moment de l'apparition au sein de la vacuole d'une substance qui détruit l'alcalinité (cas de l'apparition des composés phénoliques).

Un des faits les plus marquants de notre étude des vacuoles est lié à cette question de la métachromasie. On sait, en effet, que le cytoplasme vivant possède une réaction alcaline tandis que les vacuoles ont généralement un suc acide. Or, nous avons montré sur de nombreux exemples que certaines vacuoles avaient une réaction alcaline ; en particulier les cellules de méristémes ont toujours un vacuome qui a ces propriétés et cela est vrai non seulement pour les cellules embryonnaires des Gymnospermes, mais encore pour celles que l'on observe chez les Phanérogames (Rosier, Iris).

Ainsi la présence d'un vacuome alcalin est peut-être un caractère constant des cellules jeunes. Lorsque la cellule vieillit au contraire, ses vacuoles deviennent toujours, soit neutres, soit acides.

CHAPITRE II

Essais de divers colorants

Dans les chapitres précédents, nous n'avons parlé que de colorations vitales de l'appareil vacuolaire, car dans tous les cas étudiés nous avons vu que les colorants vitaux principaux, (rouge neutre, bleu de crésyl, bleu de méthylène), sont fixés uniquement par des éléments du vacuome. Nous pouvons nous demander si cette propriété de fixer les colorants vitaux est spéciale au vacuome et ce qu'elle devient lorsqu'on emploie d'autres teintures vitales (bleu de Nil, vert Janus, violet de méthyle, etc...).

Nous allons exposer rapidement ce qui a été fait en zoologie dans cete voie, puis faire l'historique des colorations vitales chez les végétaux. Nous exposerons ensuite nos recherches personnelles sur l'emploi des divers colorants.

A. — Colorations vitales chez les animaux

Les colorations vitales ont été largement employées par les zoologistes pour mettre en évidence certaines particularités dans la cellule vivante. De nombreux colorants ont été utilisés et l'on a expérimenté avec eux sur les tissus les plus variés. Cependant il existe très peu de véritables travaux d'ensemble, où soit discuté le mode d'action des divers colorants sur les cellules. Chaque auteur, en général, s'est servi d'un colorant ou deux tout au plus, qui donnaient de bons résultats dans un cas particulier et qui auraient peut-être agi différemment sur d'autres objets (1).

(1) Ce n'est pas le cas cependant pour un travail de Fischel (1901) sur les colorations vitales chez les Batraciens, car l'auteur a fait l'essai d'une centaine de colorants vitaux. Son mémoire est certainement un des plus importants parmi ceux qui traitent des colorations vitales.

Le petit nombre de travaux importants s'explique en partie par la difficulté du sujet : Il est très pénible en effet, de faire l'observation des cellules vivantes ou des cellules colorées vitalement parce que l'examen ne peut être que de courte durée et parce qu'il est nécessaire de se mettre à l'abri des causes d'altération qui peuvent venir fausser les résultats.

On peut citer parmi les plus marquants des mémoires consacrés aux recherches vitales chez les animaux ; les travaux de MM. Arnold (1900), Michaelis, Laguesse (1912), Fauré Frémiet (1908) Laguesse et Debeyre (1912). Parmi les plus récents ceux de Cowdry, Levi et des Lewiss (1915) tiennent une place importante.

On trouve dans un article très documenté de M. de Beauchamp, paru dans *l'Année biologique* en 1908, une mise au point très claire de la question des colorations vitales et un exposé des résultats obtenus par les auteurs. On y apprend que ces derniers ont réussi à colorer vitalement les éléments cellulaires les plus différents, noyau, substances de réserve, gouttelettes graisseuses, produits de dégénérescence, vacuoles, mitochondries et même le cytoplasme.

On n'a donc jamais reconnu dans la cellule animale que les éléments qui se coloraient vitalement, appartenaient à une même formation cellulaire. Une simple remarque peut être faite, c'est que les auteurs sont d'accord en général pour reconnaître, que ce sont les éléments les moins vivants si l'on peut dire de la cellule, qui se colorent : telles sont les inclusions de diverse nature, les vacuoles, les produits de dégénérescence ; mais d'autre part on a signalé la coloration vitale d'éléments qui passent pour être éminemment vivants tels que le noyau, les mitochondries et même les chromosomes.

Plusieurs travaux chez les animaux signalent la coloration vitale des mitochondries par des colorants tels que le violet dahlia, le violet de méthyle, le vert Janus. Il s'agit de savoir si les éléments qui ont été colorés ainsi sont toujours comparables, c'est pourquoi une discussion des résultats est nécessaire.

M. Michaelis, en 1900, fait des expériences de coloration vitale qui font suite à celles d'Erlich et de Galeotti. Il colore vitalement des granules nombreux dans les cellules du foie de la souris, au moyen de rouge neutre et de bleu de méthylène. Dans les glandes salivaires de mammifères, il colore souvent de cette façon des granules et des filaments. Dans le pancréas de la grenouille, il met en évidence aussi de beaux et gros filaments : à ce sujet, il parle de « schöner Bild », mais il ne cache pas que la méthode est difficile à manier et qu'elle donne des résultats inconstants. Il a employé aussi le vert Janus qui colore plutôt les filaments tandis que le rouge neutre colore les grains de sécrétion.

MM. Laguesse et Debeyre (1912) et Laguesse (1912) emploient comme l'avait fait précédemment M. Michaelis, le vert Janus au 1/30.000 dans l'eau salée à 9 p. mille. Ils l'expérimentent sur divers tissus vivants. Ils colorent ainsi dans la cellule vivante de petits éléments ronds ou filamenteux, qui sont d'après eux exactement superposables à ceux que l'on colore après fixation par les méthodes de Benda et de Meves. Ils en tirent la conclusion que la coloration vitale au vert Janus est spécifique du chondriome et ils y voient une indication au sujet du rôle d'*éclectosomes*, au sens de Regaud qu'on attribue aux mitochondries.

MM. Lewis plus récemment ont fait des colorations très intéressantes sur des tissus d'embryons de poulet. Ils colorent au moyen de vert Janus des éléments mitochondriaux très allongés en forme de chondriocontes. Ils constatent des variations de forme très nombreuses et rapides de ces corps à tel point qu'un dessin n'en était pas possible, des changements importants se produisant dans l'espace d'une minute. Les chondriocontes peuvent aussi se réunir ensemble en un réseau.

A côté des mitochondries, MM. Lewiss distinguent dans le cytoplasme des granules, des vacuoles, des globules de graisse, un appareil canaliculaire.

Les globules de graisse ne se colorent pas vitalement ; au

contraire les petites vacuoles fixent électivement le bleu de Nil et le bleu de crésyl. Elle contiennent de petits granules animés de mouvements browniens qui peuvent apparaître au bout de quelques minutes dans une vacuole primitivement homogène.

Il n'y a aucune relation d'après l'auteur entre les mitochondries et les vacuoles, bien que certains aspects puissent faire penser à une élaboration de vacuoles par une mitochondrie, lorsque les deux éléments viennent au contact par suite de leurs déplacements au sein du cytoplasme.

Les recherches de M. Levi (1915) ont été poursuivies sur les mêmes objets et confirment les résultats des Lewiss.

On voit que les travaux les plus récents sur les colorations vitales chez les animaux indiquent une différence d'action suivant le colorant employé. Il paraît certain que l'on a coloré comme chez les végétaux de vraies vacuoles (Lewiss) au moyen de bleu de Nil et de bleu de crésyl, dans d'autres cas on a coloré par le vert Janus des granules et des filaments qui sont plutôt assimilables aux microsomes et aux plastes de la cellule végétale (Laguesse).

Un moyen d'apporter de la clarté dans ces difficiles problèmes consiste à étudier l'effet de ces colorants dans la cellule végétale où la distinction des systèmes d'éléments est plus facile.

Bien peu de travaux ont été faits dans cette intention. Nous allons cependant passer en revue les recherches sur les colorations vitales chez les végétaux.

B. — Colorations vitales chez les végétaux

Pfeffer a publié, en 1886, un important mémoire sur l'introduction des couleurs d'aniline dans les cellules vivantes. Il déclare lui-même qu'il est le premier auteur ayant réussi à obtenir la pénétration de substances colorantes à l'intérieur des tissus végétaux vivants. Il a employé un grand nombre de produits colorés dans les essais qu'il a entrepris, mais il a

donné la préférence au bleu de méthylène. Il n'a utilisé ni le rouge neutre ni le bleu de crésyl. Bien qu'il ait effectué un grand nombre de colorations vitales des vacuoles et qu'il ait expérimenté sur des plantes très variées, il n'a mis en évidence aucune particularité morphologique remarquable des vacuoles. En particulier, il n'a pas décelé les formes vacuolaires spéciales des cellules de méristémes.

Il a vu que certains colorants ne pénétraient pas dans la vacuole, mais s'accumulaient dans le cytoplasme, tel est le cas du violet de méthylène et, dans cette circonstance, le colorant est fixé par de petites granulations cellulaires.

Il a remarqué que tantôt les vacuoles se coloraient d'une façon homogène, tantôt leur contenu se précipitait sous forme de granulations colorées. La présence de composés tanniques serait la cause, d'après lui, de la fixation du bleu de méthylène, et de sa précipitation au sein des vacuoles dans la plupart des cas. Enfin, il a montré que la possibilité de fixer un colorant est lié à la vitalité de la cellule. Dès que celle-ci meurt, le colorant abandonne la vacuole et c'est au tour du noyau de se colorer.

Des essais qu'il a entrepris lui ont montré que la cellule peut extraire un colorant d'une solution extrêmement faible, au cent millième ou au millionème, et l'accumuler à l'intérieur de la vacuole (pouvoir d'accumulation élective).

Depuis les recherches de M. Pfeffer, le domaine des colorations vitales chez les végétaux est demeuré à peu près inexploré jusqu'aux travaux de M. P. A. Dangeard. On doit mentionner toutefois l'emploi fait par Lauterborn, du rouge neutre pour colorer les vacuoles des Levures; plus tard, M. Guilliermond signale les mêmes faits ; M. Nicolle colore les grains de métachromatine chez les Bactéries. Enfin, MM. Beauverie et Guilliermond donnent quelques brèves descriptions de grains d'aleurone colorés vitalement (Graminées, Ricin).

En 1916, sont publiées les recherches de M. P. A. Dangeard sur la coloration vitale des vacuoles. L'auteur emploie surtout

le bleu de crésyl, le bleu de méthylène et le vert Janus. En étudiant de jeunes organes des bourgeons, M. Dangeard montre que les vacuoles dans les méristèmes de nombreuse plantes, sont à l'état de granules, de filaments ou de réseaux, qui fixent les colorants vitaux avec intensité. Ces éléments ressemblent parfois à s'y méprendre à un chondriome, mais M. Dangeard assiste à leur transformation en vacuoles et il les rattache sans doute possible au système vacuolaire.

Ainsi, M. P. A. Dangeard, par la méthode des colorations vitales, découvre des états encore ignorés de l'appareil vacuolaire dans les plantes.

Au moment où nous avons fait nos premières recherches sur les colorations vitales chez les végétaux, nous avons employé le bleu de crésyl et le rouge neutre d'une manière exclusive. Cela s'explique, car ce sont certainement les deux meilleurs colorants vitaux du vacuome. Le premier de ces colorants qui a servi principalement pour les belles découvertes de M. P. A. Dangeard a le mérite d'une carrière déjà fructueuse en cytologie végétale : il a en outre l'avantage de donner des images très visibles au microscope. Nous avons emprunté le second aux zoologistes chez lesquels il est d'un usage courant. Le rouge neutre s'est révélé dans quelques cas supérieur au bleu de crésyl et il a facilité ainsi beaucoup nos recherches. Il fut mis aussi à contribution à peu près à la même date chez les Phanérogames par M. Guilliermond qui a publié quelques observations isolées dans le domaine des colorations vitales à la suite de celles de M. P. A. Dangeard.

M. Guilliermond ajoute peu de chose aux observations vitales de M. Dangeard sur le vacuome ; il constate comme l'avait fait ce dernier que les vacuoles ont la propriété de fixer la plupart des colorants vitaux et qu'elles renferment en solution colloïdale une substance capable de se précipiter en corpuscules à leur intérieur.

Il ressort de cet historique que, chez les animaux, on a coloré des éléments très variés (produits de réserve, de dégénéres-

cence, vacuoles, mitochondries, etc.). Chez les végétaux on a coloré principalement les vacuoles (MM. Pfeffer, P. A. Dangeard et Pierre Dangeard, Guilliermond). En dehors de la coloration de l'appareil vacuolaire, on ne peut signaler chez les végétaux que celle des granulations du cytoplasme par Pfeffer et celle des mitochondries des Champignons par M. Guilliermond au moyen de violet Dahlia. Cette dernière coloration est signalée comme étant très difficile à réaliser et comme très imparfaite.

Par conséquent, chez les végétaux, le système vacuolaire a presque le privilège des colorations vitales. C'est pourquoi la question se pose de savoir s'il existe une spécificité d'action de certains colorants vitaux.

Chez les végétaux, des colorants tels que le rouge neutre, le bleu de crésyl, le bleu de méthylène se fixent dans l'immense majorité des cas sur les éléments du vacuome. On peut donc les dire *colorants vitaux vacuolaires ;* on pourrait joindre à eux le bleu de Nil et le bleu de toluidine qui donnent des résultats moins parfaits.

D'autres, comme le violet Dahlia, le violet de méthyle, colorent dans certains cas les vacuoles, dans d'autres cas des granulations du cytoplasme (microsomes pour Pfeffer, mitochondries pour M. Guillermond).

Le vert Janus colore les vacuoles des Géraniacées d'après M. P.-A. Dangeard ; il colorerait les mitochondries d'une manière spécifique chez les animaux (Laguesse, Cowdry).

C. — **Recherches personnelles**

En ce qui concerne d'abord les colorants vitaux vacuolaires, (bleu de méthylène, bleu de crésyl, rouge neutre, etc...), nous avons vérifié qu'ils se fixent toujours sur l'appareil vacuolaire, quelles que soient les substances renfermées dans cet appareil, en particulier qu'il renferme ou non des composés phénoliques.

C'est là un phénomène très remarquable qui laisse à penser

qu'il existe une substance particulière dans le système vacuolaire, présente à tous les états de l'évolution et qui est capable de fixer les colorants vitaux (en formant sans doute avec eux une combinaison). Cette substance est très probablement de nature protéïque et elle a été désignée par M. P.-A. Dangeard sous le nom de métachromatine.

En se reportant à nos travaux exposés précédemment, on verra que le très grand nombre de cas étudiés permet d'établir, que ces colorants vitaux donnent une coloration spécifique du vacuome la plupart du temps et que toutes les vacuoles végétales sont capables de fixer ces colorants.

Cependant, nous devons maintenant examiner quelques exemples qui montrent une exception à la règle générale, ce qui prouve que la spécificité énoncée plus haut n'est pas absolue.

Nous étudierons successivement :

1°. — Des cas de colorations vitales du noyau,

2°. — Des colorations vitales de vacuoles par des colorants non spécifiques du vacuome (violet dahlia, violet de méthyle, vert Janus),

3°. — Des colorations vitales des microsomes par le violet dahlia, le violet méthyle et le vert Janus.

1°. Coloration du noyau.

a) *Cas de coloration vitale des chromosomes du noyau, au moyen du rouge neutre.* — Il s'agit d'expériences de colorations vitales réalisées dans les grains de pollen du *Gingko biloba* au moment où se produisent les divisions de maturation.

Le pollen, au début du mois d'avril, subit les deux divisions réductrices. Ces deux mitoses se succèdent rapidement et le cloisonnement qui intervient pour donner les tétrades, ne se produit qu'une fois les deux divisions nucléaires achevées.

Lorsque par conséquent, on cherche à observer vitalement du pollen de *Gingko* au début d'avril, on trouve dans les préparations, soit des *diades*, soit des *tétrades* en nombre élevé. Il

suffit pour cela d'écraser avec précaution un sac pollinique et de l'examiner immédiatement après, dans une goutte de solution de glucose à 2,5 0/0 colorée légèrement au moyen de rouge neutre.

Nous avons constaté dans ces conditions que les noyaux en division se colorent vitalement ; ce sont les chromosomes qui fixent le rouge neutre, ce qui permet de les observer à des stades divers de la division : la teinte prise est rouge orangé ou brique. On sait que le nombre des chromosomes chez le *Gingko* est de 12, ce qui correspond sensiblement aux résultats de l'observation vitale (*fig.* 15 *et* 16, *pl. IX*).

Il s'agit là d'une coloration vitale, car le reste de la cellule ne prend aucune coloration, du moins au début de l'observation, tandis que les chromosomes sont intensément colorés. Plus tard, le cytoplasme peut prendre une légère teinte rose diffuse.

Le grain de pollen ne paraît pas souffrir du traitement auquel il est soumis pendant les quelques minutes de l'examen au microscope : son cytoplasme présente une apparence homogène, sans trace de vacuoles discernables, mais il contient des granules nombreux, dont les plus gros un peu anguleux et réfringents, correspondent à des plastes porteurs d'amidon.

b) *Coloration vitale des noyaux au repos par le violet dahlia et le violet de méthyle.* — Nous avons employé le violet dahlia sur des objets que nous connaissions déjà ; d'abord sur l'albumen de Ricin. Il s'est comporté comme un bon colorant vital et il a pénétré dans les cellules, donnant au bout de quelques heures une belle teinte bleue à la couche externe de l'albumen.

Par contre, l'observation microscopique des cellules périphériques de l'albumen, nous a montré que les noyaux étaient les seuls éléments colorés de la cellule et que c'était à eux que l'albumen devait sa coloration d'ensemble.

Malgré cette coloration des noyaux, les cellules paraissaient vivantes ; aussi nous avons essayé d'en avoir la preuve, autre-

ment que par la seule impression de bon état qu'elles nous donnaient. Nous avons pour cela tenté de superposer à la coloration précédente une deuxième, en employant cette fois le rouge neure.

L'expérience a parfaitement réussi, et nous avons obtenu de doubles colorations très nettes, de cellules dont le noyau se trouvait teint en violet et les vacuoles en orangé. Cette double coloration n'est pas restée stable, car au bout de quelques minutes les noyaux se sont complètement décolorés, le violet dahlia émigrant dans les cellules profondes, quant aux vacuoles elles sont demeurées colorées par le rouge neutre.

Cette expérience prouve selon nous que la coloration du noyau peut être réalisée dans la cellule vivante. En effet, lorsque la coloration au rouge neutre du vacuome est possible, on peut affirmer que la cellule n'est pas morte, par conséquent les cellules d'albumen de Ricin dont le noyau est coloré par le violet dahlia étant capables de fixer en surplus le rouge neutre sur leur vacuome, il en résulte qu'elles sont encore vivantes.

Nous avons opéré à une autre reprise sur un albumen de Ricin germé, au stade où la racine pointe en dehors de la graine. Le violet dahlia en solution à 1/40000 est resté quinze heures en contact avec l'albumen qui a pris une coloration bleu intense. Nous avons constaté que les noyaux de la couche périphérique étaient colorés en bleu violet, mais les cellules n'étaient pas mortes comme nous l'avons vérifié en employant le rouge neutre de la même façon que précédemment.

Un essai sur une très jeune plantule de Pin maritime provenant d'une graine à coque non éclatée nous a permis de confirmer les résultats précédents. La plantule, immergée dans une solution de violet dahlia au 1/40000, prend une teinte violet pâle au bout de quelques heures.

L'observation au microscope montre que les noyaux de l'épiderme des cotylédons sont bien colorés en violet bleu, tandis que le reste de la cellule ne présente qu'une légère coloration diffuse. Nous avons employé ensuite le rouge neutre

qui a donné une double coloration très nette, les noyaux restant colorés en bleu et les vacuoles prenant avec le rouge neutre une teinte orangée.

Le violet de méthyle employé au lieu de violet dahlia, s'est comporté exactement de même.

Il est possible de conclure de ces faits que la coloration vitale du noyau est réalisable au moyen de certains colorants, tels que le violet dahlia et le violet de méthyle, dans des cellules dont l'activité vitale est ralentie (graines). Le noyau dans ces conditions se colore d'une façon homogène et sans qu'aucune différenciation soit visible à son intérieur.

2° Colorations des vacuoles par le violet dalhia, le violet de méthyle, le vert Janus.

Dans de nombreuses circonstances, les colorants précédents se sont comportés comme des colorants vitaux vacuolaires et par conséquent ont agi à la manière du bleu de crésyl et du rouge neutre. A côté de ces deux colorants, on peut placer comme colorant vital vacuolaire le *bleu de Nil*, le *bleu de toluidine* et le *bleu de méthylène*.

Ainsi, le violet dahlia et le violet de méthyle, ont été essayés sur de jeunes feuilles entières de *Taxus baccata* (fin d'avril). Le séjour dans le colorant a été prolongé vingt-quatre heures et nous avons remarqué qu'il y avait eu seulement pénétration du colorant par la base coupée de la feuille. Beaucoup de cellules à l'emplacement de la pénétration du colorant sont mortes ; dans quelques-unes pourtant, il y a eu coloration des vacuoles en violet et la teinte prise est à peu près identique, qu'il s'agisse du violet dahlia ou du violet de méthyle. Les vacuoles colorées appartenaient à des cellules tannifères et nous n'avons pas pu réaliser la coloration vitale des cellules embryonnaires. Les cellules embryonnaires sont d'ailleurs toujours plus difficiles à colorer vitalement que les cellules tannifères, même avec le rouge neutre et le bleu de crésyl (*fig.* 15, *pl. I*).

Cette expérience montre que le violet dahlia et le violet de méthyle sont susceptibles de se comporter comme des colorants vitaux vacuolaires ; mais que leur action est difficile à obtenir et leurs résultats incomplets (en effet s'il s'était agi de rouge neutre dans les mêmes conditions, la coloration vitale se serait faite en quelques heures et n'aurait pas porté uniquement sur les vacuoles tannifères).

Ce cas de coloration vitale est loin d'être isolé, car nous avons obtenu une coloration des vacuoles avec le violet dahlia dans de nombreux exemples (jeunes feuilles d'Iris, plantules de Conifères).

Le vert Janus a coloré vitalement aussi, les vacuoles des jeunes feuilles d'Abies, mais le séjour doit être prolongé (vingt-quatre heures et plus) et le colorant, très dilué. La teinte prise est rougeâtre un peu violacée et n'a lieu que dans les cellules tannifères, comme pour les précédents colorants.

3° Coloration vitale des microsomes.

Un autre mode de fixation de ces colorants vitaux est plus remarquable que le précédent ; il s'agit de la coloration élective, dans certains cas, de très petits éléments granuleux que nous croyons devoir rattacher au *sphérome* (microsomes de M. P.-A. Dangeard).

Laissons séjourner en effet quelques heures dans une solution faible de violet dahlia de jeunes feuilles d'Abies du mois d'août, ou bien même le sommet du point végétatif. On constate au bout de quelque temps (trois ou quatre heures), que le colorant pénètre par les endroits lésés et donne aux tissus une teinte violet pâle. Si nous examinons une portion de la zone dans laquelle s'est introduit le colorant, nous voyons que de nombreuses cellules épidermiques contiennent de très petits grains colorés en violet. Il s'agit certainement là d'une coloration vitale car le noyau et les plastes sont restés complètement incolores.

Les petits éléments colorés en violet sont de forme arrondie

en général, mais il existe aussi des apparences de très petits bâtonnets : ils sont très nombreux et paraissent atteindre le chiffre d'une centaine par cellule. Ils sont très distincts des plastes, lesquels sont beaucoup plus gros, ovoïdes, réfringents et sont demeurés complètement incolores. Par l'ensemble de leurs caractères, nous croyons donc que les petits éléments colorés vitalement par le violet dahlia sont des microsomes (*sphérosomes*). Les très petits bâtonnets qu'on observe et qui ne se voient pas sur le vivant, seraient dus à des déformations des éléments primitivement sphériques.

Elle s'observe chez Abies, non seulement avec le violet dahlia, mais encore avec le violet de méthyle. Si l'on emploie une solution faible de vert Janus, on réussit à colorer les mêmes éléments microsomiques, en vert. Ces microsomes peuvent être colorés vitalement aussi bien dans les cellules embryonnaires dont le vacuome n'est pas réfringent (*fig.* 19, *pl. I*) que dans les cellules tannifères à vacuome volumineux et très distinct : dans ce dernier cas, il est possible d'observer des cellules montrant une double coloration, les microsomes étant verts et les vacuoles rosées (coloration au vert Janus seul) (*fig.* 18, *pl. I*).

Dans cette dernière circonstance, il y a donc avec un même colorant, coloration métachromatique des vacuoles (rose) et coloration non métachromatique des microsomes (verte) dans une même cellule au moyen du vert Janus. Je ne sais si le nom de ce colorant est dû à cette propriété de virage de teinte qui en fait un colorant à double face, ce qui est certain c'est que l'on peut ainsi mettre en évidence deux systèmes d'éléments de la cellule vivante et les distinguer par leurs propriétés chromatiques différentes.

Nous avons encore réussi à colorer les microsomes dans les objets suivants :

Chez un Iris (*fig.* 17, *pl. I*), les très jeunes feuiles dont la longueur ne dépasse pas cinq millimètres, peuvent être colo-

rées par un séjour d'une heure dans une solution diluée de violet de méthyle. Nous avons mis ainsi en évidence, à l'intérieur du cytoplasme des cellules épidermiques, une quantité de petits granules colorés vitalement en violet; il en existe une cinquantaine par cellule. Ce sont évidemment des microsomes, bien que dans les très jeunes cellules dont il s'agit, la distinction d'avec les plastes ne soit pas toujours nette dans une préparation vitale.

Au contraire chez le *Gingko biloba*, nous avons obtenu des colorations analogues aux précédentes, mais comme elles se sont produites dans des cellules où la distinction des systèmes d'éléments est facile, *in vivo*, nous avons eu la certitude que notre interprétation sur la coloration vitale des microsomes était exacte.

Il s'agissait d'une plantule âgée de *Gingko biloba* dont la tigelle avait environ trois centimètres de longueur ; les cotylédons à ce moment sont encore engagés à l'intérieur de l'endosperme et ils ont encore certainement une fonction absorbante au contact des réserves.

En plaçant ces cotylédons entiers dans une solution de violet dahlia, on observe qu'ils prennent au bout de quelque temps une teinte violette surtout à leur extrémité. Il s'agit là d'une pénétration du colorant à l'intérieur des cellules épidermiques vivantes.

Celles-ci, examinées au microscope, montrent un vacuome réfringent en réseau, disposé autour du noyau arrondi (*fig.* 16, *pl. I*). Les plastes sont également très distincts, allongés et réfringents. En dehors du vacuome et du plastidome, qui ne sont nullement colorés, il y a dans le cytoplasme des cellules de peties granulations assez nombreuses colorées électivement en violet. Il s'agit là certainement des microsomes qui ont fixé le violet dahlia (*fig.* 16, *pl. I*).

Dans l'orge, nous avons coloré de la même façon des microsomes dans l'épiderme des jeunes feuilles (plantules très

jeunes ayant 24 heures de germination à 22°), au moyen de violet dahlia.

Chez Pinus maritima, dans l'épiderme des cotylédons d'une plantule très jeune, on peut obtenir de même une coloration de très petits éléments distincts du vacuome et de gouttelettes d'huile au moyen de violet dahlia.

Ces petits éléments doivent correspondre aux microsomes bien qu'il soit évidemment difficile dans ces cellules de Pin, d'affirmer que les plastes ne sont pas colorés eux aussi. Cependant, si nous nous reportons aux figures que nous avons données de ces cellules vivantes (*fig.* 1, *pl. III*) nous voyons qu'il n'a été figuré au dehors du noyau que deux sortes d'éléments inclus dans le cytoplasme : l'aleurone, c'est-à-dire le vacuome et les gouttelettes d'huile. En réalité, il est possible de voir, mais avec une certaine difficulté, en dehors du vacuome et de l'huile de petites granulations du cytoplasme qui correspondent soit à des microsomes, soit à des plastes.

Sur les préparations fixées par la méthode de Regaud, nous les avons toujours indiquées sur les trabécules du cytoplasme. Il est absolument certain que les colorations vitales au violet dahlia portent sur une partie de ces granules et d'après ce que nous avons vu chez *Gingko* où les plastes ne sont pas teintés par le dahlia, il faut conclure que ce sont les microsomes seuls et non les plastes qui fixent le colorant vital chez Pinus maritima.

DISCUSSION ET RÉSUMÉ DES PRINCIPAUX RÉSULTATS

Lorsqu'on jette un coup d'œil d'ensemble sur les principaux résultats relatés précédemment, on est amené à des considérations d'ordre général qui vont être exposées maintenant. Les unes, les plus importantes, se rapportent à l'appareil vacuolaire ou vacuome, les autres aux constituants cytoplasmiques et aux colorants vitaux.

ART. 1. — VACUOME.

A. — **Vacuome dans les méristèmes**

L'évolution vacuolaire a été décrite dans les *méristèmes des Gymnospermes* où elle était inconnue jusqu'alors.

Toutes les cellules embryonnaires, même les plus jeunes, renferment un vacuome colorable vitalement par les teintures vitales vacuolaires (rouge neutre, bleu de crésyl, bleu de méthylène, bleu de Nil, etc..).

La forme de cet appareil est très variable, car elle change constamment sous l'influence des mouvements cytoplasmiques qui sont ainsi révélés dans les cellules les plus jeunes. Ce genre de déplacement paraît être différent du mouvement habituel décrit dans les cellules adultes et qui comporte une circulation des microsomes ou des plastes.

Lorsque la substance vacuolaire est demi-fluide, elle peut s'étirer comme une masse qui serait ductile et malléable et prendre par suite des pressions, en sens divers qu'elle subit l'aspect de filaments et de réseaux.

Lorsque la substance du vacuome est peu abondante, ce qui est souvent le cas dans ces cellules jeunes à cytoplasme

épais, les réseaux vacuolaires peuvent être d'une finesse extrême.

L'épaisseur de ces trabécules vacuolaires peut ne pas dépasser dans certains cas une fraction de μ et j'ai noté à plusieurs reprises qu'il s'agissait de dimensions voisines des limites de la visibilité. On ne les voit nettement que parce qu'il s'agit de filaments colorés, car des corps colorés qui auraient dans toutes les dimensions l'épaisseur de ces éléments seraient probablement invisibles.

B. — **Substances renfermées dans le vacuome**

Les substances renfermées dans le vacuome sont certainement diverses. Il n'est pas possible dans l'état actuel de la biochimie de donner une idée, même approchée de la nature de ces substances dans la plupart des cas.

Question de la métachromatine

L'idée de M. P.-A. Dangeard d'après laquelle il existerait dans toutes les vacuoles une substance fondamentale, la métachromatine, est d'un très haut intérêt. Plusieurs de nos observations sont en faveur de cette hypothèse. Le fait que le vacuome possède toujours un pouvoir électif particulier vis-à-vis des colorants vitaux, quelle que soit la plante examinée et quelle que soit la cellule considérée est un argument puissant en faveur de l'hypothèse d'une substance ou d'un groupe de substances caractéristiques du vacuome.

Le fait aussi que des granules protéiques précipités se colorent parfois d'une manière intense dans le vacuome, la présence d'un liseré sidérophile autour des boules phénoliques, tout cela vient à l'appui des idées Dangeardiennes.

Plusieurs circonstances sont même de nature à renforcer la comparaison qu'a faite M. P.-A. Dangeard de la substance fondamentale du vacuome des Phanérogames et de la substance connue depuis longtemps chez les Protistes, les Champignons et les Algues sous le nom de *métachromatine*.

On sait que M. Guilliermond et ses élèves ont toujours protesté contre une assimilation entre la métachromatine des Champignons et la protéine contenue dans les vacuoles des Phanérogames. On doit s'en étonner car M. Guilliermond a été un des premiers à reconnaître dans les grains d'aleurone des Graminées, la présence d'une substance azotée très voisine de la métachromatine.

Les propriétés principales de la métachromatine consistent dans son pouvoir électif et la grande affinité qu'elle présente pour les colorants vitaux. Un autre caractère est la coloration qu'elle prend en coloration vitale. Cette propriété est due à la réaction alcaline de cette substance comme nous l'avons montré.

M. Guilliermond, dans ses recherches sur les vacuoles des Phanérogames, a commencé par attribuer leur propriété de fixer les colorants aux composés phénoliques qu'elles renferment. Pour cet auteur, les vacuoles qui étaient dépourvues de composés phénoliques ne se coloraient pas vitalement.

Nos observations sont venues démontrer que cette idée était erronée. Il y avait là une survivance d'une ancienne idée de Pfeffer qui avait montré que les vacuoles riches en tannin fixaient particulièrement bien le bleu de méthylène. Il est exact que, dans un tissu, les cellules tannifères fixent parfois très rapidement le bleu de méthylène alors que les éléments voisins restent incolores; mais, si l'on a la patience d'attendre quelques instants, on observe bientôt la fixation du colorant dans les cellules voisines qui sont dépourvues de composés phénoliques.

Cette propriété fixatrice particulière des tannins est surtout sensible avec le bleu de méthylène ; avec le rouge neutre, ou le bleu de crésyl au contraire, dans une plantule de Pin, la coloration vitale se fait aussi bien et aussi vite dans les cellules sans tannin des cotylédons que dans l'épiderme tannifère de l'hypocotyle.

D'ailleurs, dans ce travail, il est facile de se rendre compte

que le vacuome a été très souvent coloré vitalement et souvent même avec grande facilité alors qu'il ne renfermait pas trace de composés phénoliques (cas des grains d'aleurone, cas des vacuoles des cellules embryonnaires).

La cause est donc entendue : la faculté de fixer les colorants vitaux est une propriété fondamentale du vacuome qui ne dépend pas des substances qui peuvent apparaître au cours de l'évolution, à l'intérieur de cet appareil.

Or, il semble satisfaisant d'admettre qu'un phénomène aussi général que celui-ci a pour support une substance particulière présente en toute occasion dans l'appareil vacuolaire.

Cette substance serait précisément la *métachromatine* et il faudrait comprendre ce corps, non pas comme une entité chimique particulière bien définie, mais comme un *groupement chimique de corps ayant* un ensemble de propriétés communes.

On admet bien, chez les Végétaux, la présence d'une classe chimique très répandue constituée par les composés *phénoliques* qui peuvent être très variés et comprendre des corps tels que le *fucosane* des algues et les divers *tannins* des Phanérogames. Ces éléments appartiennent pourtant au même groupement parce qu'ils ont un ensemble de propriétés communes résultant de la présence d'une ou plusieurs fonctions phénoliques.

Pourquoi n'en serait-il pas de même en ce qui concerne la métachromatine. Dans ce cas, il s'agit d'une substance protéique certainement très complexe de sorte que les particularités distinctives dans ce domaine ont souvent un caractère empirique ; lorsque M. A. Meyer a cru définir d'une manière très nette la métachromatine des Champignons, il n'a fait que donner une série de réactions dont la valeur intrinsèque est discutable.

Le fait que ces réactions de Meyer ne réunissent pas auprès des substances protéiques vacuolaires de tous les végétaux

ne prouve nullement, selon nous, que les protéines du vacuome n'ont pas un certain nombre de traits communs.

Rappelons-nous que la chromatine du noyau n'est pas une substance parfaitement définie chimiquement et que cependant, on applique ce nom à toutes les substances fondamentales des noyaux. Par analogie, le nom de métachromatine appliqué comme le fait M. Dangeard au corps protéique contenu dans le vacuome est tout à fait justifié et possède une profonde signification.

D. — Mode de formation des tannins

Ces corps sont très abondants dans la plupart des feuilles de Conifères. Nous croyons que l'un d'eux est *l'acide ellagique* que nous avons reconnu par un certain nombre de réactions dans les feuilles de l'If (*Taxus baccata*).

Nos recherches montrent que les composés tanniques sont absents dans le massif initial de la tige, mais qu'ils apparaissent de très bonne heure dans les premiers mamelons foliaires.

Les cellules embryonnaires les plus jeunes possèdent donc un vacuome dépourvu de composés phénoliques. Ces corps apparaissent ensuite progressivement dans le système vacuolaire et leur formation constitue un *simple épisode* de l'évolution chimique des vacuoles dans certaines cellules. L'apparition de ces composés n'a aucune relation avec un état morphologique spécial du vacuome, mais elle détermine une réfringence spéciale de l'appareil qui devient alors très visible dans la cellule vivante.

L'élaboration des tannins n'est donc pas le fait de « mitochondries » comme plusieurs auteurs crurent le reconnaître dans ces dernières années, puisque ces corps sont toujours contenus dans le vacuome.

On sait que dans la période qui a précédé la notion d'un chondriome, les tannins ont été considérés comme prenant naissance soit dans les vacuoles ordinaires, soit dans des réservoirs spéciaux (vésicules à tannin) (Klerker, Gardiner, etc...).

Les auteurs figuraient dans une même cellule des vacuoles ordinaires non tannifères et des globules tanniques de consistance épaisse qui semblaient apparaître d'une manière indépendante avant de se déverser dans les vacuoles (Klerker).

Nous n'avons jamais rencontré de dispositions semblables. *Lorsque le tannin apparaît dans une cellule, il imprègne en même temps toutes les parties de l'appareil vacuolaire* où sa concentration paraît être identique en tous les points à un instant donné. Jamais on n'observe deux sortes de vacuoles. Dans une des figures données par Klerker, il semble bien que l'auteur ait pris le noyau non coloré à la suite de l'action du bichromate pour une vacuole non tannifère.

E. — **Réaction du suc vacuolaire**

Le suc contenu dans le vacuome a toujours un caractère légèrement alcalin dans les cellules embryonnaires des méristèmes. Ce caractère imprime aux colorants vitaux un virage de teinte qui est un phénomène de métachromasie.

La cessation de l'alcalinité coïncide pour les cellules qui évoluent en éléments sécréteurs avec l'apparition des composés phénoliques. Le suc vacuolaire devient alors légèrement acide.

Nos recherches montrent que l'emploi des colorants vitaux, en particulier celui du rouge neutre, peuvent servir à déterminer avec une précision assez grande quelle est la réaction du suc vacuolaire.

F — **Les vacuoles peuvent-elles naître « de novo »**

Nos observations dans les bourgeons des Conifères ne sont pas en faveur d'une naissance de « novo » des vacuoles.

En effet, nous avons vu que, dans l'épiderme des jeunes feuilles par exemple, le tannin se formait de très bonne heure dans l'appareil vacuolaire. Il en résulte que si, à cette époque, il se produisait de nouvelles vacuoles directement dans le cytoplasme, on les distinguerait des autres plus anciennes par

leur absence de tannin ; il nous paraît en effet difficile d'admettre qu'il puisse y avoir néoformation d'une vacuole qui aurait d'emblée des caractères qui se sont réalisés pour les autres vacuoles qu'après une évolution plus ou moins longue.

Or, le fait que toutes les parties du vacuome se montrent toujours au même stade d'évolution chimique exclut pour nous cette hypothèse.

Reste la question de savoir si les vacuoles ne peuvent pas se former de « novo » avant que l'élaboration du tannin ne se soit produite, mais alors il semble que les nouvelles vacuoles au moment de leur apparition se distingueraient des autres soit par leur taille plus petite, soit par leur caractère plus fluide ou au contraire plus épais ; or, on n'observe rien de semblable.

Nous croyons donc que le schéma, encore classique, de la formation des vacuoles dans les cellules de méristème est absolument démenti par les faits et qu'il n'existe aucune raison pour admettre une naissance de « novo » des vacuoles au sein du cytoplasme. Nous verrons que l'étude de l'aleurone apporte des arguments non moins forts en faveur de l'autonomie du vacuome.

G. — **Aleurone.**

Le point de départ de nos recherches sur l'aleurone a été l'observation suivante : en cherchant à colorer vitalement l'appareil vacuolaire d'une jeune plantule de Pin maritime, nous avons été surpris de constater que l'épiderme renfermait au lieu de vacuoles normales, un système de filaments et de réseaux très fins dont l'existence était insoupçonnée.

En examinant des plantules de différents âges et des embryons de graine, la certitude a été acquise que ces éléments dérivaient directement des petits grains d'aleurone présents dans la graine et qu'ils se transformaient en vacuoles ordinaires dans leur évolution ultérieure.

Ces phénomènes d'évolution de l'aleurone ont alors été

suivis en détail chez le Pin maritime et d'autres Gymnospermes, puis chez le Ricin et chez les Graminées.

La démonstration a été donnée que l'aleurone constitue un état particulier du vacuome dans les graines, dû aux conditions spéciales de vie ralentie et de faible teneur en eau qui se rencontrent alors.

II. — Formation des vacuoles dans une plantule au cours de la germination

Lorsqu'une plantule germe, ses tissus s'hydratent et les cellules par conséquent deviennent riches en eau. Or, cet enrichissement en eau ne provoque pas l'apparition de vacuoles en des points quelconques du cytoplasme, mais tout l'appareil vacuolaire de la plantule s'édifie aux dépens des grains d'aleurone de la graine. On savait déjà que la plupart des grains d'aleurone se vacuolisent pendant la germination, mais on ignorait que c'était là le seule mode de naissance des vacuoles typiques. En un mot, nos recherches sur l'aleurone établissent ce fait très important que les vacuoles ne se forment jamais « de novo » au sein du cytoplasme pendant la période germinative.

C'est la même conclusion que celle à laquelle nous étions arrivés par l'étude des méristèmes.

Si quelque doute subsistait au sujet de ce résultat de nos recherches, il suffirait pour qu'il soit levé de se reporter à notre description de l'évolution de l'aleurone, donnée précédemment et aux figures qui lui correspondent. Nous croyons que les faits que nous avons observés sont de nature à trancher le débat sur la genèse des vacuoles chez les Végétaux.

Le vacuome se comporte donc comme un système autonome de la cellule végétale.

I. — Formation du tannin et de l'anthocyane dans les plantules

Chez les Conifères, lorsque l'aleurone s'est transformée en un système vacuolaire, on peut observer la formation de

tannin dans les cellules épidermiques. Un pigment anthocyanique se forme ensuite très souvent et sa production a toujours lieu dans des cellules qui étaient précédemment tannifères, comme si le pigment dérivait directement des composés tanniques.

J. — Evolution de l'aleurone, chez le Ricin et chez les Graminées.

Chez le Ricin, les phénomènes d'évolution de l'aleurone ont été observés pendant la maturation de la graine et pendant la germination. Nous avons montré qu'il existe une *réversibilité* très remarquable dans l'évolution vacuolaire, car, pendant la maturation, on assiste à la transformation d'une grande vacuole en grains d'aleurone séparés et pendant la germination, une série de stades tout à fait comparables conduisent de nouveau à un état vacuolaire largement dilaté.

En outre, ces recherches permettent de distinguer chez le Ricin, à côté des grains d'aleurone typiques, bien connus de tous, de petits grains à structure différente, dépourvus des inclusions caractéristiques des précédents et qui sont seuls présents dans la couche périphérique des cellules d'albumen

C'est dans ces éléments de la périphérie de l'albumen qu'on observe des filaments et des réseaux vacuolaires très remarquables soit avant maturation, soit pendant la germination des graines. Ces états vacuolaires n'étaient pas connus : leur connaissance est d'un grand intérêt, parce que, grâce à eux, nous surprenons sur le vif les mouvements très compliqués dont la cellule est le siège avant de passer dans l'état de repos qui caractérise la graine et que, d'autre part, nous assistons au réveil d'une activité comparable pendant la première période de la germination.

La production transitoire de ces réseaux aux dépens de l'aleurone paraît être un fait assez fréquent, car nous en avons décrit plusieurs exemples chez les Graminées (radicule de l'orge, du blé, jeunes feuilles de blé).

Dans l'épiderme des jeunes racines de blé, les états vacuolaires filamenteux que nous avons découverts, ont une très grande ressemblance avec un appareil mitochondrial.

Cependant la formation de filaments et de réseaux, aux dépens des grains d'aleurone pendant leur évolution en vacuoles, n'est pas un phénomène général, car lorsque l'aleurone se trouve dans la graine sous forme de grains assez gros, ceux-ci se réunissent et se fusionnent ensemble par simple contact après s'être suffisamment gonflés.

K. — **Pollen**

Le fait d'avoir obtenu des colorations vitales dans les grains de pollen constitue une acquisition nouvelle dans l'histoire des colorations vitales.

Comme la poussière pollinique est formée de cellules ayant subi un dessèchement considérable, il était très intéressant d'y démontrer la présence d'un vacuome et de faire connaître ainsi, que les substances vacuolaires ne sont pas des produits transitoires, mais qu'elles se conservent dans les circonstances les plus variées.

D'autre part, nous avons pu mettre en évidence des *formes réticulées du vacuome* dans plusieurs cas, au sein du cytoplasme des cellules génératives. En même temps, il existe une différence de réaction souvent très nette entre les substances vacuolaires dans les cellules végétatives et dans les cellules génératives, et les colorations vitales la mettent en évidence.

Ces recherches laissent prévoir que le vacuome se transmet par les gamètes eux-mêmes.

ART. 2. — CONSTITUANTS CYTOPLASMIQUES

A. — **Observations vitales sur les plastes et les microsomes. Méristèmes des Gymnospermes.**

Nous avons eu l'occasion d'examiner de très nombreuses cellules vivantes et d'y observer les plastes et les microsomes.

Les premiers ont généralement, dans les méristèmes une forme globuleuse ou bien leur aspect est celui de bâtonnets, parfois assez allongés (*Larix*), mais la forme filamenteuse n'a jamais été observée.

Chez le *Larix*, les éléments du plastidome sont en forme de bâtonnets allongés dans les cellules très jeunes et sont globuleux dans les cellules adultes. Chez le *Cédrus*, l'*Abies*, le *Picea*, le *Taxus*, les plastes sont granuleux ou bien en courts bâtonnets dans les cellules embryonnaires, tandis qu'ils sont globuleux ou elliptiques dans les cellules adultes.

Les plastes, dans l'épiderme des jeunes feuilles de Conifères, forment de l'amidon de très bonne heure : dès les premières ébauches foliaires, on les trouve chargés ordinairement d'un produit de nature amylacée, qui se colore en brun par l'eau iodée. Cette élaboration a lieu dans toute l'étendue du plaste qui paraît être imprégné d'amidon d'une manière homogène.

Les microsomes ont été observés constamment dans les cellules épidermiques : nous avons fréquemment assisté à leurs déplacements au sein du cytoplasme. Ces faits sont bien connus depuis les travaux de M. P.-A. Dangeard. Jamais ces grains, dans une cellule normale, ne sont animés de mouvements browniens malgré leur taille réduite (un μ et même moins). Ils réduisent légèrement l'acide osmique.

Nous n'avons pas constaté qu'il y eut, en dehors des plastes, parmi les granulations du cytoplasme deux sortes d'éléments dont les uns seraient des granulations lipoïdes et les autres des mitochondries inactives.

Pollen. — Dans les cellules polliniques des Gymnospermes, nous avons trouvé en dehors du vacuome, des plastes généralement amylifères et des microsomes qui ont les caractères ordinaires. Ces éléments s'observent dans les cellules vivantes. Chez l'If (*Taxus baccata*), nous avons constaté que l'amidon, très abondant avant maturation du pollen, disparaissait complètement dans le pollen mûr. Ces observations ont été faites non seulement dans les cellules végétatives, mais encore dans

les cellules génératives lorsque le pollen mûr est pluricellulaire (*Biota*, *Cephalotaxus*, *Cupressus*, *Gingko*). Elles établissent que les cellules pollimiques sont des éléments complets renfermant un vacuome, un plastidome et un sphérome.

ART. 3. — OBSERVATIONS SUR LES CELLULES APRES FIXATION ET COLORATION (Méthode de Regaud)

On a ignoré longtemps qu'il y eut un système vacuolaire dans les cellules jeunes des méristèmes. Cet appareil se trouvant alors fréquemment sous forme de canalicules très fins, ne peut pas être mis en évidence au moyen des méthodes de fixation ordinaire. Ceci est évident : pour que ces minces boyaux situés au sein du cytoplasme, se retrouvent sur des coupes d'objets fixés, il faut et il suffit que le cytoplasme lui-même soit très bien conservé. Or, ces conditions ne sont réalisées qu'avec l'emploi de fixateurs cytoplasmiques que l'on a encore appelés « fixateurs mitochondriaux ». Les principaux de ceux-ci sont les solutions employées par Altmann, Benda, Meves, Laguesse, Regaud.

Nous avons fait choix du fixateur de Regaud qui nous a donné les résultats suivants concernant le vacuome.

A. — **Méristèmes des Gymnospermes**

Vacuome. — Dans les cellules embryonnaires, le vacuome se retrouve à l'état de petites vacuoles arrondies ou de canalicules complètement incolores dans lesquelles on ne trouve que de rares granulations colorées.

Dans les cellules où commence l'élaboration du tannin, le vacuome se colore en noir très fortement et dans son ensemble : on peut observer alors des réseaux vacuolaires entièrement colorés par l'hématoxyline ferrique (Cèdre, Abies).

Dans les éléments où un composé tannique abondant s'est formé, celui-ci apparaît comme une masse jaune d'or entourée d'une écorce noire formée par une précipitation de métachro-

matine à sa surface. Il en résulte un aspect qui a été décrit récemment à tort comme une des phases de l'élaboration des composés phénoliques par des mitochondries.

Plastidome. — Les plastes se colorent en noir par la méthode de Regaud et leur forme n'est pas altérée en général. Cependant chez le *Larix*, les plastes qui sont naturellement en bâtonnets allongés dans les cellules, se retrouvent sous forme de petits éléments onduleux sur les préparations fixées.

Sphérome. — Les microsomes ne sont pas toujours colorés au moyen de la méthode de Regaud. Pour les mettre en évidence avec une grande netteté il faut, comme l'a montré M. P.-A. Dangeard se servir de préférence du liquide de Laguesse.

B. — **Aleurone**

L'aleurone constitue un état particulier du vacuome dans la graine. L'accumulation d'une matière protéique voisine de la métachromatine dans les grains d'aleurone rend ceux-ci très chromatiques : aussi se colorent-ils d'une façon très intense par la méthode de Regaud.

Ces caractères, qui sont aussi ceux des plastes, pourraient amener une confusion avec ces derniers. D'autant plus que, dans certains tissus, les grains d'aleurone sont très petits (méristèmes de l'embryon du Pin maritime, cellules périphériques de l'albumen du Ricin). On les reconnaît cependant à leur taille ordinairement plus grande que celle des plastes et au fait qu'ils se colorent d'une façon plus intense que les plastes par l'hématoxyline ferrique.

Nous insistons sur ce point que les propriétés chromatiques des grains d'aleurone, constituent un nouvel exemple d'une coloration d'ensemble du vacuome par une méthode mitochondriale.

Au cours de la germination, les grains d'aleurone se transforment en vacuoles et pendant cette période, le suc vacuolaire se diluant de plus en plus, on assiste à une coloration

progressive des éléments du système. Sur les plantules les plus jeunes, la protéine des vacuoles aleuriques étant encore très abondante, il se produit une coloration noire de tout le contenu vacuolaire qui se montre souvent sous l'aspect d'un fin précipité granuleux (Pin maritime, Ricin). Plus tard, le suc est devenu très fluide et la vacuole n'est plus occupée que par des granules précipités, soit sur les parois, soit autour des inclusions encore intactes (Ricin).

Il est remarquable de retrouver sur les préparations fixées tous les états vacuolaires observés dans les cellules vivantes : fusions des vacuoles aleuriques ensemble, précipitations diverses de la protéine).

Cependant pour les cellules à très petits grains d'aleurone (cellules épidermiques de Pin maritime, méristèmes de Pin, cellules périphériques du Ricin), on ne peut pas retrouver nettement, après fixation, les réseaux vacuolaires que l'on observe dans les cellules vivantes après coloration vitale. C'est là un exemple parmi beaucoup d'autres de la supériorité de la méthode vitale quand il s'agit de recherches délicates sur les vacuoles.

Chez le Ricin, nous avons donné pour les cellules d'albumen des descriptions plus exactes que celles qui avaient été fournies jusqu'alors. Elles correspondent assez bien aux figures qu'en ont publié M. Beauverie et plus récemment M. Mottier, mais nous avons précisé plusieurs points particuliers, grâce aux connaissances que nous avions acquises précédemment au moyen d'observations vitales.

Par contre, nous n'avons pas retrouvé dans les cellules d'albumen la structure qui a été décrite récemment par M. Guilliermond : nous n'avons pas observé, en effet, de « chondriocontes » très allongés et sinueux dans le cytoplasme des cellules d'albumen et les plastes s'y trouvent seulement sous forme de grains ou de courts bâtonnets.

ART. 4. — OBSERVATIONS SUR LES COLORANTS VITAUX ET LEUR EFFET DANS LA CELLULE

A. — Mode d'action des colorants vitaux

Les colorants vitaux dont nous avons étudié l'action dans les tissus vivants sont assez nombreux : rouge neutre, bleu de crésyl, bleu de méthylène, bleu de Nil, bleu de toluidine, violet de méthyle, violet dahlia, vert Janus.

Parmi eux, nous avons distingué ceux qui se fixent sur le vacuome dans l'immense majorité des cas, ce sont le rouge neutre, le bleu de crésyl, le bleu de méthylène, le bleu de Nil et le bleu de toluidine, nous les avons appelé des *colorants vitaux vacuolaires*.

Au contraire, le violet de méthyle, le violet de dahlia et le vert Janus peuvent selon les circonstances colorer les vacuoles, les noyaux ou les microsomes. Ce sont des colorants vitaux non spécifiques.

La coloration des noyaux a été obtenue dans des cellules où l'activité était ralentie (albumen de la graine de Ricin, embryon de la graine de Pin maritime). La coloration prise par le noyau est diffuse; cependant dans un seul cas, le grain de pollen de *Gingko biloba*, nous avons observé la coloration vitale très nette des chromosomes du noyau ; mais il s'agissait d'une coloration au moyen de rouge neutre (1).

En ce qui concerne les microsomes, nous avons montré que leur coloration vitale se faisait à la longue, au moyen de solutions très diluées de violet de méthyle, violet dahlia, vert Janus. Parfois on constate de *doubles colorations vitales* du vacuome et des microsomes dans une même cellule. Les plastes n'ont jamais fixé le colorant vital, de sorte que dans les cellules où la distinction du plastidome et du sphérome est difficile en raison de leurs caractères morphologiques voisins, on pourrait se servir avec avantage de la méthode des colorations vitales pour séparer les deux sortes d'éléments.

(1) Ce colorant vital vacuolaire montre donc, en cette occasion des propriétés anormales.

B. — Pénétration des colorants vitaux à travers les membranes

Il est certain que les colorations vitales se produiraient avec une beaucoup plus grande facilité s'il n'y avait pas l'obstacle opposé à la pénétration par des membranes épidermiques souvent très peu perméables.

L'imperméabilité des membranes est fonction de l'âge des cellules, car les points de végétation et les jeunes ébauches foliaires se laissent facilement pénétrer par les colorants. D'autre part, lorsqu'un épiderme possède naturellement un rôle absorbant (épiderme des jeunes plantules de Gymnospermes, cotylédons des plantules de Ricin, cellules d'albumen, etc.), il se montre extrêmement perméable aux colorants vitaux : c'est une propriété précieuse que nous avons mise à profit bien des fois.

Sur les cotylédons à trois faces du Pin maritime, nous avons fait cette constatation très curieuse que seule, la face externe qui se trouve en contact avec l'endosperme, possède un épiderme facilement perméable aux colorants vitaux. Les deux autres faces qui, par leur situation, ne peuvent pas participer à l'absorption dans les conditions naturelles, se montrent imperméables vis-à-vis des colorants.

Un phénomène semblable se produit chez le Ricin où l'épiderme du cotylédon qui se trouve en contact avec l'albumen, fixe plus rapidement le rouge neutre que l'épiderme de la face opposée qui n'a pas naturellement de rôle absorbant, mais le fait est beaucoup moins net que chez les Conifères (1).

A ce genre de recherches se rapportent les expériences suivantes faites chez le Ricin en vue de montrer que dans les conditions naturelles les échanges ont lieu entre cellules, de vacuoles à vacuoles :

(1) Dans ces deux cas, l'imperméabilité d'une région épidermique des cotylédons ne correspond à aucune particularité sensible des membranes. En effet, il est impossible de constater sur une coupe une différence morphologique entre les membranes des surfaces cotylédonnaires, quelle que soit la région envisagée

Une jeune plantule de Ricin a été séparée de son albumen avec précaution ; puis les deux moitiés de ce dernier ont été placées dans une solution de rouge neutre : la plantule était maintenue pendant ce temps, afin qu'elle ne s'altère pas, à l'intérieur d'un autre albumen, dont la plantule avait été sacrifiée. Lorsque la couche interne du premier albumen avait pris une teinte rouge foncé par suite de la coloration vitale de ses cellules, on rapprochait les cotylédons de la plantule et on les maintenait en contact étroit avec cette partie colorée de l'albumen.

Dans ces conditions, au bout de quelques minutes, on pouvait constater que la face externe des cotylédons foliacés avait pris une teinte rosée, indiquant qu'il y avait eu passage du rouge neutre du vacuome de l'albumen dans celui des cotylédons.

Cette expérience montre que les colorations vitales peuvent nous renseigner sur le mécanisme de la nutrition cellulaire, puisqu'un colorant vital paraît se comporter vis-à-vis d'une cellule à la manière d'un aliment soluble.

Dans cet exemple du Ricin, nous avons deux assises cellulaires en présence, qui, toutes les deux sont, capables de fixer à leur intérieur un colorant vital lorsqu'on les place dans un bain colorant. Lorsque ces deux assises sont mises en rapport par leurs membranes intactes, l'un des tissus peut soutirer à l'autre le colorant qu'il avait absorbé précédemment en présence d'une solution. L'épiderme des cotylédons du Ricin manifeste donc ainsi un pouvoir absorbant supérieur à celui de l'albumen.

CONCLUSIONS

La méthode des colorations vitales qui a été notre principale technique, s'est révélée une véritable méthode de travail, pouvant soutenir la comparaison, avec les meilleurs procédés histologiques. C'est là, un point important acquis pour l'avenir.

Chez les Végétaux, toute cellule apparaît capable de fixer certains colorants réputés vitaux à son intérieur. C'est une propriété que possède la cellule vivante et elle peut être considérée comme caractéristique de l'état de vie.

Par ce procédé des colorations vitales, on peut s'assurer que toutes les cellules renferment un appareil particulier, le vacuome, susceptible de se dilater en larges vacuoles et dont un caractère important est le pouvoir électif vis-à-vis des colorants.

Le *vacuome* constitue un appareil autonome qui se transmet au cours des divisions cellulaires d'une génération à la suivante : on n'assiste jamais à une *néorformation de vacuoles au sein d'un cytoplasme normal.*

C'est là une ancienne idée de de Vries que nous avons reprise, dégagée de la théorie inexacte du tonoplaste, et qui est maintenant solidement étayée, pensons-nous.

Il est difficile d'admettre que le vacuome soit un simple dépôt dans la cellule d'eau et de substances banales : les propriétés physiologiques très importantes des vacuoles ne pourraient pas s'expliquer s'il en était ainsi. On ne pourrait pas comprendre non plus que le vacuome soit un appareil constant se transmettant héréditairement, s'il n'était constitué que

par un amalgame de produits de déchets et de substances de réserve. Nous croyons donc que les propriétés du vacuome peuvent s'expliquer par la présence à son intérieur d'une substance fondamentale protéique à laquelle le nom de *métachromatine* au sens de M. P.-A. Dangeard doit être conservé.

L'aleurone constitue un état particulier du vacuome dans la graine ; ses principaux caractères résultent de la situation dissociée de cet appareil, de sa déshydratation et de l'importante accumulation des matériaux protéiques à son intérieur. Les deux premières conditions peuvent se trouver réalisées dans un grain de pollen ou même dans un méristème, mais la concentration des réserves azotées ne s'y rencontre pas au même degré que dans les graines de sorte que l'assimilation complète avec l'aleurone ne peut pas être tentée.

Les formes filamenteuses et réticulées du vacuome se produisent lorsque les conditions suivantes sont réalisées à l'intérieur des tissus :

1° Un cytoplasme épais ou encombré d'abondantes productions figurées telle que l'huile ;

2° Une substance vacuolaire de consistance demi-fluide ;

3° Une activité cellulaire intense. Elles ne correspondent pas à la présence d'un produit particulier dans le vacuome. Ces filaments et ces réseaux ne constituent jamais qu'un état transitoire correspondant à une certaine période de l'évolution vacuolaire.

Le vacuome peut se colorer parfois dans son ensemble par une méthode mitochondriale (aleurone, réseaux tannifères).

C'est un exemple de plus du caractère non spécifique de ces méthodes.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

ALTMANN (R.). — *Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen*. Leipzig, 1880 (mit 2 Abbild. u. XXI. Taf.).

ALVARADO. — (1) *El chondrioma y el systema vacuolar en las cellulas vegetales*. (*Boletin de la Real Sociedad Espanola de Historia natural*, 1918).

(2) *Plastosomas y leucoplastos en algunas fanerogamas* (*Trabajos del Laboratorio de Investigaciones biologicas de la Universidad de Madrid*, 1918).

(3) *Sobre el estudio del condrioma de la celula vegetal con el methodo tono argentico* (*Boletin de la Real Sociedad Espanola de Historia natural*, 1918).

(4) *Sobre el verdarero significado del sistema de fibrillas, conductor de las excitationes en las plantas de Nemec* (*Boletin de la Real Sociedad Espanola de Historia natural*, 1919).

ARNOLD (J.). — *Supravitale Farbung Mitochondrien ähnlichen granula in den Knorpelzellen, nebst Bemerkungen über die Morphologie der Knorpel glycogens* (*Anat. Anz*, XXXII, p. 361-8).

ARNOLD (J.). — *Über Plasmastrukturen* (*Jena*, 1914).

BEAUVERIE. — *Contribution à l'étude des grains d'aleurone et particulièrement des globoïdes* (*Ann. Sc. natur.* 1908).

BENDA (C.). — (1) *Weitere Mitteilungen über die Mitochondria* (*Verh. der phys. ges. zu* Berlin. *Arch. f. Anat. u. Phys.* 376-383, 1899).

(2) *Die Mitochondria* (*Ergbn. d. Anat. u. Entwikl. gesch.* 1902).

(3) *Die Bedeutung der Zelleibstruk für die Pathologie* (*Verh. d. Deutsch. path. geseli.* 17. *Tagung in München*).

BELAIEFF (W.). — *Zur Lehre von dem Pollenschlauche der Gymnospermen*. (*Ber. deutsch. botan. Gesell.* 9.280-286 pl. 18, 1891) et 1893. II.)

BENSLEY. — *On the nature of the canalicular apparatus of animal cells*. (*Biol. Bull.* 19. 174-194, fig. 3.)

BERGEN (VON). — *Zur Kenntniss gewisser Strukturbildner im Proto-*

plasma verschiedener Zellenarten. (*Arch. f. Mikrosk. Anat.* Bonn, 1904, Vol. LXIV, p. 498-574.)

Biourge (Ph.). — *Recherches morphologiques et chimiques sur les grains de pollen.* (*La cellule*, t. VIII, 1892.)

Braemer (L.). — *Les tannoïdes, introduction critique à l'histoire physiologiques des tannins et des principes immédiats des végétaux qui leur sont chimiquement alliés.* (*Thèse de Pharmacie.* Toulouse, 1890.)

Cajal (R.). — *L'appareil réticulaire de Golgi-Holmgren coloré par le nitrate d'argent. Travaux du Laboratoire de recherches biologiques de l'Université de Madrid*, (1907, Vol. V, p. 151-155.)

Certes (A.). — (1) *Sur un procédé de coloration des Infusoires et des éléments anatomiques pendant la vie* (*Zool. Anz.* IV, p. 208-12).

(2) *Colorabilité élective, intra vitam, des filaments sporifères du Spirobacillus gigas et de divers microorganismes d'eau douce et d'eau salée par les couleurs d'aniline.* (*C. R. Ass. franc. Avanc. Sc.*, XXIX, 9 p. pl. VII-VIII.)

Chauveaud. — (1) *Un nouvel appareil sécréteur chez les Conifères.* (*C. R. Ac. Sc.* I, p. 1093.)

(2) *Disposition du nouvel appareil secréteur dans le cèdre de l'Himalaya* (*Cedrus Deodora*). (*Bull. du Museum*, 1903.)

(3) *L'appareil sécréteur de l'If* (*Taxus baccata*). (*Bull. du Museum*, 1904.)

Combes (Raoul). — *Recherches microchimiques sur les pigments anthocyaniques.* (*Assoc. p. l'Avanc. des Sc.*, Dijon, 1911.)

Cowdry (E.-V.). — *The vital staining of mitochondria with Janus green and diethylsafranin in human blood cells.* (*Internat. Monatschr. f. Anat. u. Physiol.* 31 : 267-286, 1914.)

Cowdry (N.-H.). — *A comparaison of mitochondria in plant and animal cells.* (*Biol. Bull.* 1917.)

Grato (E.). — *Die Physode, ein Organ des Zellenleibes.* (*Ber. d. deutsch. botan. Gesellsch.* Bd. XI, 1892.)

Dangeard (P.-A.). — (1) *La métachromatine chez les Mucorinées* (*Bull. Soc. Mycol.* 1916, T. XXXII, fasc. 1 et 2).

(2) *Observations sur le chondriome des Saprolegna, sa nature, son origine et ses propriétés.* (*Bull. Soc. Mycol.* T. XXXII, fasc. 3 et 4, 1916.)

(3) *Note sur la vitesse de pénétration des substances dans la cellule végétale.* (*Bull. Soc. botan. Fr.* 1916.)

(4) *La métachromatine chez les Algues et les Champignons.* (*Bull. Soc. botan. Fr.* T. XVI, sér. 4, 1916.)

(5) *Nouvelles observations sur la nature du chondriome dans les plantes et ses rapports avec le système vacuolaire.* (*Bull. Soc. bot. Fr.* 1916.)

(6) *Note sur les corpuscules métachromatiques des Levures.* (*Bull. Soc. Mycol. Fr.* T. XXXII, fasc. 1 et 2, 1916.)

(7) *Sur la nature du chondriome et son rôle dans la cellule.* (*C. R. Ac. Sc.* Paris, t. 166, p. 439, 1918.)

(8) *Sur la distinction du chondriome des auteurs en vacuome, plastidome et sphérome.* (*C. R. Ac. Sc.* Paris, T. 169, p. 1005, 1er déc. 1919.)

(9) *Vacuome, plastidome et sphérome dans l'Asparagus verticillatus.* (*C. R. Ac. Sc.* Paris, 1920.)

(10) *Plastidome, vacuome et sphérome dans Selaginella Kraussiana.* (*C. R. Ac. Sc.* Paris, 1920, p. 301.)

(11) *La structure de la cellule végétale et son métabolisme.* (*C. R. Ac. Sc.* 22 mars 1920.)

(12) *La structure de la cellule végétale dans ses rapports avec la théorie du chondriome.* (*C. R. Ac. Sc.* 1921, p. 120.)

(13) *Sur la nature du sphérome dans la cellule végétale.* (*C. R. Ac. Sc.* 28 nov. 1921.)

(14) *Recherches sur la structure de la cellule dans les Iris.* (*C. R. Ac. Sc.* 26 juin 1922, p. 1653-1659.)

(15) *Sur la structure de la cellule chez les Iris.* (*C. R. Ac. Sc.* p. 7 à 12, 3 juillet 1922.)

Dangeard (Pierre). — (1) *Sur l'évolution du système vacuolaire chez les Gymnospermes.* (*C. R. Ac. Sc.* Paris, 23 février 1920, p. 474.)

(2) *Sur la métachromatine et les composés tanniques des vacuoles.* (*C. R. Ac. Sc.* t. 171, 22 nov. 1920, p. 1016.)

(3) *L'évolution des grains d'aleurone en vacuoles ordinaires et la formation des tannins.* (*C. R. Ac. Sc.* Paris, t. 172, 18 avril 1921, p. 995.)

(4) *L'évolution des grains d'aleurone en vacuoles ordinaires pendant la germination du Pin maritime.* (*Bull. Soc. botan. Fr.* t. XXI, 1921, Fasc. 3-4, p. 223-230.)

(5) *Sur la formation des grains d'aleurone dans l'albumen du Ricin.* (*C. R. Ac. Sc. Paris*, t. 173, 7 nov. 1921, p. 857.)

(6) *Sur l'évolution des grains d'aleurone du Ricin pendant la germination.* (*C. R. Ac. Sc.* Paris, déc. 1921, p. 1401.)

(7) *Sur l'origine des vacuoles aux dépens de l'aleurone pendant la*

germination des Graminées. (*C. R. Ac. Sc.* 30 janvier 1922, p. 319.)

(8) *Sur l'origine des vacuoles et de l'anthocyane dans les feuilles du Rosier.* (*Bull. Soc. Botan. Fr.* T. LXIX, 1922.)

(9) *Le vacuome dans les grains de pollen des Gymnospermes.* (*C. R. Ac. Sc.* Paris, T. 176, p. 905, 1923.)

DUBREUIL (G.). — *Le chondriome et de dispositif de l'activité sécrétoire aux différents stades du développement des éléments cellulaires de la lignée connective descendant du lymphocyte.* (*Arch. d'Anat. microsc.* 1913.)

DUESBERG (J.). — *Plastosomen, « Apparato reticolare interno » und chromidialapparat.* (*Ergebn. Anat. Entw.* 20, 567-916.)

DUESBERG. — *On the present status of chondriosome problem.* (*Biol. Bull.* 36, 71-81.)

EMBERGER (L.). — (1) *Recherches sur l'origine et l'évolution des plastides chez les Pteridophytes. Thèse,* Paris 1921.

(2) *Evolution des plastides dans le règne végétal.* (*Rev. Scientif.* 28 janvier 1922, n° 2.)

FAURÉ-FRÉMIET. — *Etudes sur les mitochondries des Protozoaires et des cellules sexuelles.* (*Arch. d'Anat. microsc.* t. XI, 1910.)

FAURÉ-FRÉMIET, MAYER et SCHAEFFER. — *Sur la constitution et le rôle des mitochondries.* (*C. R. Soc. biol.* 1909.)

FISCHEL (A.). — *Untersuchungen über vitale Färbung.* (*Anat. Hefte,* XVI, p. 415-530.)

GARDINER. — *Proc. Cambridge. Phil. Soc.* Vol. IV, VI, p. 387, 1883.

GOLGI (C.). — *Di un methodo per la facile e pronta dimostrazione dell apparato reticolare interno delle cellule nervose.* (*Boll. della Societa medico chirurgica.* Pavia, 1908, *Anno* XXII, *della Socieda* n° 2.)

GORIS. — *Recherches microchimiques sur quelques glucosides et quelques tannins végétaux.* Paris, 1903.

GROOM (P.). — *The aleurone layer of the seeds of grasses.* (*Ann. Bot* Vol. VII, p. 387-92, 1893.)

GUIGNARD (L.). — (1) *Etude sur les phénomènes morphologiques de la fécondation.* (*Bull. Soc. bot. Fr.* 1889.)

(2) *Observations sur le pollen des Cycadées* (*Journal de botanique,* 1889).

GUILLIERMOND (A.). — (1) *Contribution à l'étude cytologique des Cyanophycées.* (*Rev. génér. bot.* XVIII, 36 p. 3 pl.)

(2) *Caractères histochimiques des granulations des Mastzellen et*

rapport de ces corps avec la volutine des Protistes. (C. R. Soc. biol. 28 février, p. 307.)

(3) *Recherches cytologiques sur la germination des graines de quelques Graminées et contribution à l'étude des grains d'aleurone.* (Arch. d'Anat. microsc. t. X, fasc. II.)

(4) *A propos des corpuscules métachromatiques ou grains de volutine.* (Arch. f. Protistenkunde. t. XIX, p. 269-309, 1910.)

(5) *Sur les mitochondries des cellules végétales.* (C. R. Ac. Sc., 17 juillet, p. 199, 1 fig., 1911.)

(6) *Recherches sur le mode de formation de l'amidon et sur les plastes des Végétaux (leuco, chloro et chromoplastes). Contribution à l'étude des mitochondries chez les Végétaux.* (Arch. d'Anat. microsc., t. XIV, fasc. III.)

(7) *Sur la participation du chondriome des Champignons dans l'élaboration des corpuscules métachromatiques.* (Anat. Anz. Bd. 44, 1913.)

(8) *Sur la formation de l'anthocyane au sein des mitochondries.* (C. R. Ac. Sc. t. CLVII, 23 juin 1913, p. 1924.)

(9) *Nouvelles recherches cytologiques sur la formation des pigments anthocyaniques.* (C. R. Ac. Sc. t. CLVIII, 24 nov. 1913, p. 1000.)

(10) *Quelques remarques nouvelles sur la formation des pigments anthocyaniques au sein des mitochondries. A propos d'une note récente de M. Pensa.* (C. R. Soc. Biol. t. LXXV, 29 nov. 1913, p. 478, 1 pl.)

(11) *Recherches cytologiques sur la formation des pigments anthocyaniques. Nouvelle contribution à l'étude des mitochondries.* (Rev. génér. bot. t. XXV bis, p. 295-340, 3 pl. 1914.)

(12) *Sur l'origine des pigments anthocyaniques.* (C. R. Ac. Sc. t. CLXI, 26 oct. 1915, p. 567.)

(13) *Quelques observations sur le mode de formation des pigments anthocyaniques dans les fleurs.* (C. R. Ac. Sc. t. CLXI, 26 oct. 1915, p. 494.)

(14) *Sur la métachromatine et les composés phénoliques de la cellule végétale.* (C. R. Ac. Sc. t. CLXVI, 10 juin 1918, p. 958.)

(15) *Nouvelles recherches sur l'appareil vacuolaire chez les Végétaux.* (C. R. Ac. Sc. t. CLXXI, 1920, p. 1071.)

(16) *Sur l'origine des vacuoles dans les cellules de quelques racines.* (C. R. Soc. Biol. t. LXXXIII, 27 mars 1920, p. 411.)

(17) *A propos de la métachromatine.* (C. R. Soc. Biol. t. LXXXIII, 17 mai 1920, p. 853.)

(18) *Les constituants morphologiques du cytoplasme d'après les*

recherches récentes de Cytologie végétale. (*Bull. Scient. Fr. et Belg.* t. LIV, 1921, p. 466-512.)

(19) *Origine et évolution des vacuoles dans la cellule végétale et grains d'aleurone.* (*C. R. Soc. Biol.*, 3 déc. 1921.)

(20) *La constitution morphologique du cytoplasme dans la cellule végétale.* (*Rev. génér. des Sc.* 15 mars 1921, p. 133.)

(21) *Sur les éléments figurés du cytoplasme chez les Végétaux ; chondriome, appareil vacuolaire et granulations lipoïdes.* (*Arch. Biol.* t. XXXI, 1921, p. 82.)

(22) *A propos de l'origine de l'anthocyane* (*C. R. Soc. Biol.* t. LXXXV 13 juin 1921, p. 98.)

(23) *Remarques sur la cytologie de l'albumen du Ricin ; origine et évolution des grains d'aleurone.* (*C. R. Assoc. fr. p. Avanc. des Sc. Rouen.* 1921.)

Harper (R.-A.). — *The structure of protoplasma*, 1919.

Henneguy. — *Colorabilité du protoplasma vivant.* (*Interm. des biolog.*, I p. 198-200.)

Himmel. — *Le rouge neutre, son rôle dans l'étude de la phagocytose en général.* (*Ann. Inst. Pasteur*, XVI, p. 663-85.)

Jadin (F.). — *Du siège des principes médicamenteux chez les Végétaux*, 1894.

Jonesco (St). — *Formation de l'anthocyane dans les fleurs de Cobaea scandens aux dépens des glucosides préexistants.* (*C. R. Ac. Sc.* 7 nov. 1921, p. 850.)

Transformation par oxydation, en pigment rouge, des chromogènes de quelques plantes. (*C. R. Ac. Sc.* 21 nov. 1921, p. 1006.)

Klebs (G.). — *Einige Bemerkungen über die Arbeit von Went.* (*Botan. Zeit.* 1890, p. 549.)

Klerker. — *Uber Gerbstoffvakuolen.* (*Bihangtill. K. Svenska. Vet. Ak. Handl.*, Bd XIII (III), 1888.)

Koslowski (A.). — *Formation du pigment rouge de Beta vulgaris par oxydation des chromogènes.* (*C. R. Ac. Sc.* t. 173, 1921, p. 855.)

Laguesse et Debeyre. — *Sur les formes des chondriosomes dans quelques glandes salivaires par le Vert Janus.* (*C. R. Soc. Biol.*, 1912.)

Laguesse (E.). — *Méthode de coloration vitale des chondriosomes par le Vert Janus.* (*C. R. Soc. Biol.*, 1912.)

Lauterborn (R.). — *Untersuchung über Bau, Kernteilung und*

Bewegung der Diatomeen. (1 vol. in-4°, 165 p., 10 pl. Leipzig. 18.)

LEVI (GIUSEPPE). — *La costituzione del Protoplasma studiata su cellule viventi coltivate « in vitro » (Dall' Instituto Anatomico di Palermo Archivio di Fisiologia,* 1916.)

LEVITSKY (G.). — (1) *Über die chondriosomen in pflanzlichen Zellen.* (*Ber. d. deutsch. Botan. Gesell.* Bd XXVIII, Heft 10, 1910.)

(2) *Die chondriosomen als Sekretbildner bei den Pilzen.* (*Ber. d. deutsch. botan. Gesell.* 1913, Bd. 31.)

LEWISS (M.-R. et W.-H.). — *Mitochondria and other cytoplasmic structures in tissue cultures.* (*The american Journal of anatomy,* 1915.)

LOYEZ (M[lle]). — *Les premiers stades de la vitellogénèse chez quelques Tuniciers.* (*C. R. de l'Assoc. des Anatom.,* Nancy, 1909.)

LÖWSCHIN (A.-M.). — (1) *Vergleichende experimental cytologische Untersuchungen über mitochondrien in Blattern der höheren Pflanzen* (*Vorl. Mitt.*) (*Ber, deutsch. bot. Gesell.* 32, 266-270, pl. 5.)

(2) *Zur Frage über die Bildung d. Anthocyane in Blättern d. Rose.* (*Ber. d. deutsch. Bot. Gesell.* Bd XXXII, p. 386, 1914.)

LÜDTKE (F.). — *Beitrage zur Kenntniss der Aleuronkörner.* (*Jahrb. f. wiss. Botan.,* Bd XXI, p. 62-123.)

MANGENOT (G.). — (1) *Sur les grains de fucosane des Phaeophycées.* (*C. R. Ac. Sc.* 10 janvier 1921.)

(2) *Recherches sur les constituants morphologiques du cytoplasme des Algues. Thèse.* Paris, 1922.

MASSART. — *Color. vit. des bactéries.* (*Recueil de l'Institut botanique de Bruxelles* 1902.)

MEVÉS (FR.). — (1) *Uber den von La Valette Saint-Georges entdeckten Nebenkern (mitochondrien körper) der Samenzellen.*

(2) *Uber das Vorkommen von Mitochondrien in Pflanzenzellen.* (*Ber. d. deutsch. botan. Gesellsch.* 1904.)

(3) *Die chondriosomen als Träger erblicher anlagen. Cytologische Studien am Hühnenembryo.* (*Arch. f. mikr. Anat.* Bd LXXII, 1908.)

(4) *Historisch-kritische Untersuchungen über die Plastosomen in Pflanzenzellen.* (*Arch. f. mikr. Anat.* Bd. 89, Abt. 1, 1917.)

(5) *Uber Umwandlung von Plastosomen in Sekretkugelchen nach Beobachtungen an Pflanzenzelle.* (*Arch. f. mikr. Anat.* Bd. XC, Abt, 1918.)

MEYER (A.). — *Die Allinaute Zugleich ein Antwort auf die darstellung von Guilliermond.* (*Ber. d. deutsch. bot. Gesell.* 1916.)

MICHAELIS — *Die vitale Färbung, eine Darstellung methode der Zellgranula.* (*Arch. f. mikr. Anat.* t. LV, p. 558, 1900.)

MIKOSCH. — *Uber die Enstehung der Chlorophyllkörner.* (*Sitzb. d. Kais. Akad. d. Wiss. Wien. Jahrg.* 1885.)

MIRANDE (MARCEL). — (1) *Observation sur le mode de formation cytologique de l'anthocyane.* (*C. R. Ac. Sc.* 1916.)

(2) *Sur la formation cytologique de l'amidon et de l'huile dans l'oogone des Chara.* (*C. R. Ac. Sc.* 1919.)

(3) *Sur le chondriome, les chloroplastes et les corpuscules nucléolaires du protoplasme des chara.* (*C. R. Ac. Sc.* 1919.)

(4) *Sur la relation existant entre l'anthocyanine et les oxydases.* (*C. R. Ac. Sc.*, oct. 1922.)

MOELLENDORF (WILHEM VON). — *Zur morphologie der vitalen Granulafärbung.* (*Arch. f. mikr. Anat.* 1918.)

MOLISCH. — *Uber amorphes und cristallisirtes Anthocyans.* (*Bot. Zeit.* 1905, p. 152.)

MOREAU (F.). — (1) *Sur la formation des corpuscules métachromatiques dans les mitochondries granuleuses.* (*C. R. Soc. Biol.*, 1914.)

(2) *L'origine de la rhodoxanthine dans l'arille du Taxus baccata.* (*Bull. Soc. Bot. Fr.* 1914.)

(3) *L'origine et la transformation des pigments anthocyaniques.* (*Bull. Soc. Bot. Fr.* 1914.)

(4) *Sur l'origine de l'anthocyane dans les divers organes des Végétaux.* (*Bull. Soc. Biol.*, 1914.)

(5) *Sur la nature de la métachromasie.* (*Bull. Soc. Bot. Fr.* 1916.)

(6) *Sur l'origine mitochondriale de la lycopine.* (*Bull. Soc. Bot. Fr.* 1916.)

MOREAU (Mme F.). — *Les corpuscules métachromatiques chez les Algues* (*Bull. Soc. Bot. Fr.* 1913.)

MOTTIER (DAVID M.). — (1) *Plastides.* (*Academie of Science Proceedings.* 1918.)

(2) *Chondriosomes and the primordia of chloroplasts and leucoplastes.* (*Ann. of Bot.* 1918, p. 98-114.)

(3) *On certain plastids, with special reference to the protein bodies of Zea, Ricinus and Conopholis* (*Ann. of Botany*, July 1921.)

NEMEC (B.). — *Uber experementellerzielte Neubildung von Vakuolen im Haut umkleideten Zellen.* (*Sitzber. der Kön.* bohm. *Gesellsch. der Wiss. in Prag*, 1900.)

Nicolle. — *Les colorations vitales des microbes.* (*Bull. Inst. Past.* p. 137-144, 1903.)

Noack (K.-L.). — *Recherches sur l'individualité des plastides chez les Phanérogames.* (*Zeitschr. f. Bot.* XIII, 1-35, 1921.)

O'brien (M.). — *The proteids of Wheat.* (*Ann. Bot.*, Vol. X, p. 171-226, 1895.)

Overton (E.). — *Studien über die Aufnahme der Anilinfarben durch lebende zelle.* (*Jahrb. f. wiss. Bot.* XXXIV, p. 669-701, 1900.)

Pensa. (A). — *Fatti e considerazioni a proposito di alcune formazioni endocellulari dei vegetali.* (*Memor. d. Inst. Lomb. d. Sc. Lett.*, 1917.)

Pfeffer (W.). — (1) *Untersuchungen über die Proteinkörner und die Bedeutung des Asparagins beim Keimen der Samen.* (*Jahrb. f. wiss. Bot.* Bd. VIII, pp. 429-571, 1872.)

(2) *Über die aufnahme der Anilinfarben in lebende zelle.* (*Unters. bot. Inst. Tübingen*, II, p. 179-331, 1886.)

(3) *Zur Kenntniss der Plasmahaut und der Vakuolen, nbst Bemerkungen über den Aggregatzustand, der Protoplasmas, und über osmotische Vorgange.* (*Abh. Math. Phys. Kgl. Sächs. Ges. Wiss* 16, 1890.)

Plato (J.). — *Über die vitale Farbbarkeit der Phagocyten des Menschen und einiger Säugethiere mit neutralrot.* (*Arch. f. mikrosk. Anat.* 56, p. 868, 1900.)

Politis (Jean). — (1) *Sur l'origine mitochondriale des pigments anthocyaniques dans les fruits.* (*C. R. Ac. Sc.*, t. 172, p. 1061, 1921.)

(2) *Du rôle du chondriome dans la formation des essences dans les plantes.* (*C. R. Ac. Sc.*, Paris 11 juillet 1921.)

(3) *Sur les corpuscules bruns de la brunissure de la vigne.* (*C. R. Ac. Sc.*, t. 172, p. 870, 1921.)

Prenant. — *Les mitochondries et l'ergastoplasme.* (*Journ de l'Anat. et de la Physiol.* LXLVI, 1910.)

Prowazeck (S. Von). — *Vitalfärbung mit Neutralrot an Protozoen.* (*Zeitschr. f. wissentsch. Zool.* 63, 1898.)

Regaud. — (1) *Attribution aux formations mitochondriales de la fonction générale d'extraction et de fixation élective exercée par les cellules vivantes sur les substances dissoutes dans le milieu ambiant.* (*C. R. Soc. Biol.*, 1909.)

(2) *Les mitochondries considérées comme les agents de la fonction éclectique et pharmacopexique des cellules.* (*Rev. de Méd.* 1911.)

Rendle (A.-B.). — *On the development of aleurone grains in the Lupin* (*Ann. Bot.*, Vol. II, p. 161-7, 1888).

Romanoff (B.). — *Coloration vitale des microphytes.* (*Bull. Soc. Imp. Natur. Moscou*, p. 581-82, 3e Sér. 16, 1902.)

Rudolph. — *Chondriosomen und chromatophoren.* (*Ber. d. d. Botan. Gesellsch.* 1920.)

Sachs. — *Über das Auftreten der Stärke bei der keimung ölhartiger Samen.* (*Botan. Zeit. S.* 178, 1859.)

Sapehin. — *Untersuchungen üb. die individualität der Plastide.* (*Ber. d. deuts. Botan. Gesellsch.* 1913.)

Scharp (Lester W.). — *An introduction to the Cytology*, (New-York, 1921).

Scherrer. — *Die chromatophoren und chondriosomen von Anthoceros.* (*Ber. d. d. Botan. Gesells.* 1913.)

Schimper (A.-F.-W.). — *Untersuchungen überdie chlorophyllkörper und die ihnen homologen Gebilde.* (*Jahrb. f. wissensch. Botan.* Bd XVI, 1885.)

Strasbürger (E.). — (1) *Über das Verhalten des Pollens und die Befrüchtungvorgänge bei den Gymnospermen.* (*Hist. Beitr.* 4. 1-158, pls 1-3, 1892.)

(2) *Die pflanzlichen Zellhäute* (*Jahrb. f. wiss Bot.* 1898).

Tschirch et H. Kristzler. — *Mikrochemische Untersuchungen üb. d. Aleuronkörner.* (*Ber. pharm. gesellsch.* Bd X, Heft. 6, 1900.)

Tswett. — (1) *Etudes de physiologie cellulaire.* (*Arch. des Sc. Natur.* Genève, 1896.)

(2) *Sur la membrane périplasmique.* (*Journal de Botan.* 1899.)

Van Tieghem (Ph.). — *Hydroleucites et grains d'aleurone.* (*Journ. de Bot.*, déc. 1888.)

Vries (A. de). — (1) *Plasmolytische Studien üb. die Wand der Vacuolen.* (*Jahrb. f. wiss. Botan.* 1885.)

(2) *Über die Aggregation in Protoplasma von Drosera rotundifolia.* (*Botan. Zeit.* 1886.)

Wakker (J.). — *Studien üb. die inhaltskörper der Pflanzenzelle. Jahrb. f. wissensch. Bot.* Bd XIX, p. 423-96, 1888.)

Werminski (F.). — *Über die Natur der Aleuronkörner.* (*Ber. d. deutsch. Bot. Gesell.* Bd VI, p. 199-203.)

Went. — (1). *Die Vermehrung der normalen vacuolen durch Teilung.* (*Jahrb. f. wiss. Bot.* 1888.)

(2) *Die Vacuolen in den Fortpflanzungszellen der Algen* (*Botan. Zeit.* 1889.)

Westermaier. — *Sitzberich. Berl. Akad.* Bd XLIX, 1885.

Zimmermann. — *Die botanische mikrotechnik*, (Tübingen, 1892).

EXPLICATION DES PLANCHES

Les figures ont été exécutées au moyen de l'oculaire à dessiner de Leitz et l'objectif à immersion homogène de Zeiss, 2^{mm}.

PLANCHE I

BOURGEONS DE CONIFÈRES (COLORATIONS VITALES).

Fig. 1. — *Taxus baccata.* Portion d'épiderme d'une très jeune feuille (bourgeon de novembre) ; une cellule tannifère dont le vacuome est bleu, trois cellules embryonnaires dont le vacuome est violet métachromatique, trois cellules embryonnaires dans lesquelles le bleu de crésyl n'a pas pénétré. Gr. 1100.

Fig. 2. — *Taxus baccata.* Portion d'épiderme dans les mêmes conditions ; les granules réfringents sont des microsomes. Gr. 1100.

Fig. 3. — *Taxus baccata.* Une cellule épidermique isolée (bleu de crésyl). Gr. 1200.

Fig. 4, 5, 6, 7. — *Taxus baccata.* Divers aspects des cellules épidermiques embryonnaires après coloration au bleu de crésyl. Gr. 1200.

Fig. 8. — *Taxus baccata.* Deux cellules embryonnaires colorées au rouge neutre ; vacuome alcalin. Gr. 1200.

Fig. 9. — *Taxus baccata.* Cellule tannifère colorée au rouge neutre ; vacuome acide. Gr. 1200.

Fig. 10. — *Taxus baccata.* Sommet d'un très jeune mamelon foliaire (août, rouge neutre). Gr. 1000.

Fig. 11. — *Larix europea.* Portion d'épiderme embryonnaire d'une jeune feuille (bleu de crésyl). Gr. 1400.

Fig. 12. — *Larix europea.* Deux cellules embryonnaires d'une très jeune feuille (rouge neutre). Gr. 1400.

Fig. 13. — *Larix europea.* Deux cellules sous épidermiques en novembre (rouge neutre) Gr. 1000.

Fig. 14. — *Larix leptolepis*. Deux cellules épidermiques au sommet du point végétatif (novembre, rouge neutre). Gr. 1400.

Fig. 15. — *Taxus baccata*. Cellule épidermique tannifère de jeune feuille en novembre (violet dahlia). Gr. 1000.

Fig. 16. — *Gingko biloba*. Cellule épidermique au sommet des cotylédons d'une plantule âgée (violet dahlia). Gr. 1000.

Fig. 17. — *Iris (sp.)*. Cellule épidermique d'une jeune feuille de 2[cm] lg. (violet de méthyle). Gr. 1000.

Fig. 18. — *Abies*. Cellule épidermique d'une jeune feuille (août, vert Janus). Gr. 1000.

Fig. 19. — *Abies*. Cellule épidermique embryonnaire d'une jeune feuille (août, vert Janus). Gr. 1000.

PLANCHE II

Bourgeons de Conifères (Colorations vitales).

Fig. 1. — *Abies Nordmanniana* (bourgeon en septembre). Trois cellules épidermiques au sommet du point végétatif ; (bourgeon du mois d'août). Vacuome coloré vitalement ; Plastes ovalaires, microsomes arrondis. Gr. 1200.

Fig. 2. — *Abies Nordmanniana* (bourgeon en septembre). Trois cellules épidermiques à la base d'une très jeune feuille (même légende que précédemment). Les éléments du vacuome contiennent fréquemment des inclusions qui les font ressembler à des grains d'aleurone. Gr. 1500.

Fig. 3. — *Abies Nordmanniana* (bourgeon en février). Deux cellules épidermiques à la base d'une très jeune feuille après coloration vitale au bleu de crésyl ; vacuome coloré en violet métachromatique, plastes ovalaires et microsomes. Gr. 1500.

Fig. 4. — *Abies Nordmanniana* (bourgeon en février). Cellule épidermique, tannifère, colorée au bleu de crésyl ; vacuome coloré en bleu, plastes et microsomes (bourgeon en février). Gr. 1500.

Fig. 5. — *Abies Nordmanniana* (bourgeon en février). Cellule du parenchyme à la base de la feuille ; vacuome tannifère en bleu, formant deux vacuoles séparées, plastes et microsomes. Gr. 1500.

Fig. 6 et 7. — *Picea excelsa*. Deux cellules épidermiques au som-

met du point végétatif ; vacuome coloré par le rouge neutre, plastes fusiformes et microsomes. Gr. 1200.

Fig. 8. — *Picea excelsa*. Deux cellules épidermiques d'une très jeune feuille. Vacuome en réseau, seul figuré. Gr. 1000.

Fig. 9. — *Cedrus Libani*. Deux cellules épidermiques au sommet du point végétatif. Vacuome en sphérules séparées ; plastes ovalaires, microsomes arrondis. Gr. 1000.

Fig. 10. — *Torreya nucifera* (bourgeon au printemps). Deux cellules épidermiques au sommet du point végétatif. Cellules sous épidermiques d'une très jeune feuille. Vacuome en réseau, plastes ovalaires, quelques-uns en division. Gr. 1000.

Fig. 12. — *Gingko biloba*. Deux cellules épidermiques d'une feuille très petite ; vacuome coloré, plastes en bâtonnets, microsomes. Gr. 1000.

Fig. 13. — *Gingko biloba*. Deux cellules épidermiques d'une feuille très petite ; éléments comme plus haut. Gr. 1000.

Fig. 14. — *Pinus maritima*. Cellule de la gemmule (embryon de la graine). Grains d'aleurone colorés, cytoplasme bourré de granulations. Gr. 1000.

Fig. 15. — *Pinus maritima*. Cellule de la gemmule (plantule ; long. racine = 1^{cm}) ; vacuome en réseau fin, plastes très allongés, microsomes. Gr. 1000.

Fig. 16. — *Pinus maritima*. Cellule proche des initiales de la radicule (plantule jeune) ; vacuome seul figuré. Gr. 1000.

Fig. 17. — *Pinus maritima*. Cellule du méristème vasculaire (plantule jeune). Vacuome seul figuré. Gr. 800.

Fig. 18. — *Pinus maritima*. Cellule d'épiderme d'une très jeune feuille primordiale (plantule très jeune). Réseau vacuolaire coloré au bleu de crésyl. Gr. 1000.

PLANCHE III

Aleurone du Pin maritime

(*Colorations vitales au rouge neutre et au bleu de crésyl.*)

Fig. 1. — Portion de l'épiderme du cotylédon, dans la graine mûre ; grains d'aleurone colorés en rouge orangé, sphérules d'huile, noyau représenté par un contour (coloration vitale au rouge neutre). Gr. 1000.

Fig. 2. — Une cellule épidermique du cotylédon isolée ; grains

d'aleurone violacés (coloration vitale au bleu de crésyl). Gr. 1000.

Fig. 3. — Cellule du parenchyme de l'écorce cotylédonnaire, dans la graine (coloration vitale au bleu de crésyl). Gr. 1000.

Fig. 4. — Cellule épidermique du cotylédon de la très jeune plantule ; grains d'aleurone déformés, métachromatiques (coloration vitale au bleu de crésyl). Gr. 1000.

Fig. 5 et 6. — Cellules épidermiques des cotylédons dans une plantule un peu plus âgée ; vacuome filamenteux (coloration vitale au rouge neutre). Gr. 1000.

Fig. 7. — Deux cellules épidermiques des cotylédons chez une plantule dont la racine a 1/2 centimètre de long ; vacuome en réseau rouge orangé ; noyau invisible par suite de l'abondance des gouttelettes d'huile (coloration vitale au rouge neutre). Gr. 1000.

Fig. 8. — Deux cellules épidermiques, au sommet de l'hypocotyle, chez une plantule de même âge que précédemment ; vacuome violet, métachromatique (coloration vitale au bleu de crésyl). Gr. 1000.

Fig. 9. — Cellule épidermique à l'extrémité du cotylédon, chez une plantule de même âge que précédemment (coloration vitale au bleu de crésyl). Gr. 1000.

Fig. 10 et 11. — Deux cellules épidermiques des cotylédons chez une plantule plus âgée (long. racine = 3^{cm}) le vacuome est tannifère et n'est plus métachromatique (coloration vitale au bleu de crésyl). Gr. 1000.

Fig. 12. — Cellule épidermique de l'hypocotyle chez une plantule de même âge que précédemment ; vacuome formant une seule grande vacuole dans laquelle sont précipités des globules plus colorés (coloration vitale au bleu de crésyl). Gr. 800.

Fig. 13. — Cellule épidermique de l'hypocotyle chez une plantule jeune, long. racine = 1/2 cm.) ; vacuome coloré naturellement par l'anthocyane, plastes amylifères, microsomes (observ. vitale). Gr. 1000.

Fig. 14. — Cellule épidermique de l'hypocotyle chez une plantule plus âgée (long. racine = 3^{cm}) ; vacuome coloré par de l'anthocyane. Gr. 800.

Fig. 15. — Plantule très jeune provenant d'une graine à coque intacte, colorée vitalement par le rouge neutre. Gr. 3.

Fig. 16. — Plantule un peu plus âgée ; mêmes conditions. Gr. 3.

PLANCHE IV

Aleurone des Gymnospermes

Fig. 1, 2, 3, 4, 5. — *Cedrus Libani*. Cellules épidermiques dont le vacuome est coloré vitalement au rouge neutre. Les sphérules dans le cytoplasme représentent de l'huile.

Fig. 1. — Cellule épidermique d'un cotylédon chez une plantule très jeune (coque non ouverte). Gr. 800.

Fig. 2 et 3. — Mêmes conditions que précédemment ; fusion de grains d'aleurone. Gr. 800.

Fig. 4. — Même plantule ; base du cotylédon ; vacuome précipité sous forme de granulations rouges. Gr. 800.

Fig. 5. — Plantule âgée (long. rac. = 3^{cm}) ; sommet du cotylédon, vacuome en réseau orangé. Gr. 800.

Fig. 6, 7, 8. — *Cupressus sempervirens*. Cellules épidermiques des cotylédons (coloration vitale au rouge neutre). Gr. 800.

Fig. 6. — Face externe du cotylédon (plantule très jeune, coque non ouverte).

Fig. 7. — Sommet du cotylédon (plantule plus âgée, long. rac. = $0^{cm},5$).

Fig. 8. — Base du cotylédon (même plantule).

Fig. 9, 10, 11. — *Thuia orientalis*. Trois cellules épidermiques montrant des stades successifs de l'évolution de l'aleurone. Gr. 800.

Fig. 9. — Cotylédon, plantule dont la racine émerge au dehors.

Fig. 10. — Hypocotyle, même plantule.

Fig. 11. — Hypocotyle, même plantule, cellule tannifère.

Fig. 12. — *Cupressus horizontalis*. Cellule épidermique, face externe du cotylédon (bleu de crésyl). Gr. 1000.

Fig. 13. — *Picea excelsa*. Cellule épidermique de l'hypocotyle, (plantule dont la racine apparaît au dehors, rouge neutre). Gr. 1000.

Fig. 14, 15, 16. — *Larix europea*. Cellules épidermiques des cotylédons (coloration vitale au rouge neutre). Gr. 800.

Fig. 14. — Plantule très jeune (coque non ouverte).

Fig. 15. — Même plantule, base du cotylédon.

Fig. 16. — Plantule un peu plus âgée (long. rac. = 1/2 cm.).

Fig. 17. — *Gingko biloba*. Cellule épidermique d'un cotylédon (plantule de la graine, rouge neutre). Gr. 1000.

Fig. 18. — *Taxus baccata*. Cellule épidermique d'un cotylédon

(graine en terre depuis un mois, rouge neutre). Gr. 1000.

Fig. 19. — *Cupressus sempervirens.* Face externe du cotylédon (tubes sécréteurs sous épidermiques, colorés vitalement au rouge neutre). Gr. 10.

Fig. 20. — *Cupressus sempervirens.* Très jeune plantule dont l'épiderme est coloré vitalement par le rouge neutre. Gr. 2.

Fig. 21. — *Thuia orientalis.* Même légende Gr. 2.

Fig. 22. — *Cedrus Libani.* Même légende Gr. nat.

PLANCHE V

Maturation de l'albumen du Ricin

Fig. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8. — Cellules périphériques d'albumen colorées vitalement au rouge neutre.

Fig. 1. — Graine très jeune ; grande vacuole, sphérules d'huile dans le cytoplasme. Gr. 1000.

Fig. 2. — Graine un peu plus âgée (coque incolore), vacuole fragmentée. Gr. 1000.

Fig. 3 et 4. — Graine à coque blanchâtre commençant à durcir ; Stades de fragmentation du vacuome, huile abondante. Gr. 1200.

Fig. 5 et 6. — Graine à coque noire, un peu dure ; vacuome en réseaux variés au sein d'un cytoplasme très riche en huile. Gr. 1000.

Fig. 7. — Graine de même âge ; vacuome divisé en boules de grosseur inégale ; huile très abondante. Gr. 1000.

Fig. 8. — Graine à coque noire et très dure (maturité) ; vacuome formé par de nombreux grains d'aleurone isolés dans un cytoplasme très chargé d'huile. Gr. 1000.

Fig. 9, 10, 11, 12. — Cellules de la masse de l'albumen.

Fig. 9. — Albumen très jeune ; très grande vacuole aqueuse.

Fig. 10. — Graine à coque noirâtre, fragile ; observation directe à sec. Vacuoles séparées sans inclusions. Gr. 700.

Fig. 11. — Graine à coque noirâtre et dure ; mêmes conditions ; grains d'aleurone au début de la formation des inclusions. Gr. 700.

Fig. 12. — Graine à coque noire très dure (un peu avant maturité) ; grains d'aleurone achevés. Gr. 800.

Fig. 13. — Même graine. Grains d'aleurone de deux tailles très

différentes ; les plus petits n'ont pas d'inclusions. Gr. 600.

Fig. 14. — Deux vacuoles aleuriques au moment de la naissance des inclusions dans le suc vacuolaire. Gr. 1000.

Fig. 15. — Coupe en long d'un albumen jeune ; deux zones dans l'albumen, externe opaque, interne hyaline. Gr. 2,5.

Fig. 16 et 17. — Deux vacuoles aleuriques colorées au bleu de crésyl après fixation Regaud (graine mûre). Gr. 1000.

Fig. 18. — Vacuole aleurique d'une cellule d'albumen colorée vitalement au bleu de crésyl. Gr. 1000.

Fig. 19. — Coupe transversale d'une graine très jeune (schéma) ; albumen autour d'une cavité centrale (reste du sac embryonnaire), téguments de l'ovule. Gr. 8.

PLANCHE VI

Germination du Ricin

Fig. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8. — Cellules périphériques d'albumen, observées dans des albumen de la graine (1) et dans des germinations de plus en plus âgées (2, 3, 4, 5, 6, 7). Colorations vitales au rouge neutre sauf pour la fig. 4 colorée au bleu de crésyl.

Fig. 1. — Graine mûre ; grains d'aleurone isolés et colorés au milieu d'un cytoplasme riche en huile. Gr. 1000.

Fig. 2. — Graine demeurée six jours en terre, coque ouverte ; grains d'aleurone déformés. Gr. 1000.

Fig. 3. — Graine germée, racine apparaît au dehors ; vacuome en réseau. Gr. 1000.

Fig. 4. — Même stade, vacuome réticulé coloré par le bleu de crésyl. Gr. 800.

Fig. 5. — Graine germée (long. rac. = 1/2 cm.) ; vacuome demi-fluide en gros cordons. Gr. 800.

Fig. 6. — Graine germée (long. rac. = 1^{cm}) ; vacuome en grosses sphères. Gr. 800.

Fig. 7. — Graine germée (long. rac. = 3^{cm}) ; le vacuome forme une très grosse vacuole ; l'huile est encore assez abondante. Gr. 800.

Fig. 8. — La Plantule est âgée et l'albumen presque complètement digéré. Une grande vacuole de suc acide. Globules du cytoplasme réduisant peu l'acide osmique. Gr. 800.

Fig. 9, 10, 11. — Cellules de la masse de l'albumen.

Fig. 9. — Graine germée ; vacuome formé de grains d'aleurone typiques légèrement gonflés. Gr. 600.

Fig. 10. — Graine germée (rac. appar. au dehors). Etats divers des vacuoles aleuriques tels qu'on les trouve parfois dans une même cellule. Gr. 600.

Fig. 11. — Graine germée (long. rac. = 1^{cm}). Cellule voisine de la périphérie. Grande vacuole unique. Gr. 800.

Fig. 12. — Etats divers de la transformation des grains d'aleurone en vacuoles. (*a*) Vacuole peu modifiée ; (*b*) les inclusions fragmentées sont localisées sur la paroi vacuolaire ; (*c*) précipitation à la surface des inclusions et en deux points de la paroi vacuolaire ; (*d*) fusion de deux vacuoles entre elles. Gr. 1000

PLANCHE VII

Aleurone des Graminées

Fig. 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8. — *Blé* (germination de 48 h.). — (1) Coupe de radicule, colorée vitalement au rouge neutre. Gr. 30. — (2) Extrémité de radicule dont l'épiderme est coloré vitalement. Gr. 20. — (3) Cellule épidermique d'une petite radicule au voisinage de la coiffe. Gr. 1000 — (4) Deux cellules épidermiques plus éloignées de la coiffe ; vacuome filamenteux. Gr. 1000. — (5) Cellule épidermique un peu avant la division. Gr. 1000. — (6) La division est presque achevée. Gr. 1000. — (7) Cellule épidermique, encore plus éloignée de la coiffe ; vacuome en gros filaments. Gr. 1000. — (8) Cellule épidermique à la base d'une petite radicule ; l'évolution vacuolaire est achevée ; grande vacuole unique. Gr. 800.

Fig. 9. — *Blé* (germination de 3 jours). Cellule épidermique à quelques millimètres de la coiffe. Gr. 800.

Fig. 10. — *Blé* (germination de 3 h.). Cellule épidermique d'une jeune feuille. Gr. 1200.

Fig. 11. — Blé (germination de 48 h.). Cellule épidermique d'une jeune feuille. Gr. 1200.

Fig. 12. — *Blé* (germination de 3 jours). Cellule épidermique, base et milieu du limbe. Réseaux vacuolaires, plastes ovalaires et microsomes. Gr. 1000.

Fig. 13. — *Blé* (de 48 h.). Cellule jeune de la coiffe. Gr. 1200.

Fig. 14. — *Blé* (germination de 48 h.). Cellule adulte de la coiffe au stade où celle-ci se détache. Gr. 1000.

Fig. 15. — *Blé* (de 48 h.). Cellule du méristème vasculaire. Gr. 1000.

Fig. 16. — *Blé* (germination de 48 h. vue par la face supérieure). Gr. 2.

PLANCHE VIII

Aleurone des Graminées

Fig. 1. — *Orge*. Coupe longitudinale d'une radicule colorée vitalement au rouge neutre. Gr. 20.

Fig. 2. — *Orge*. Radicule dont l'épiderme est coloré vitalement. Gr. 20.

Fig. 3. — *Orge*. Deux cellules épidermiques de la radicule (germination de 3 heures). Vacuome coloré vitalement seul figuré. Gr. 1000.

Fig. 4. — *Orge* (germination de 24 h.). Cellule épidermique à quelques millimètres du sommet de la radicule. Vacuome formé de gros filaments. Gr. 1000.

Fig. 5. — *Orge* (germination de 24 h.). Cellule épidermique de la radicule un peu plus éloignée du sommet. Grandes vacuoles. Gr. 1000.

Fig. 6. — *Orge* (germination de 4 h.). Cellule épidermique d'une très jeune feuille. Gr. 1000.

Fig. 7. — *Orge* (germination de 24 h.). Cellule épidermique de jeune feuille, à la base de celle-ci. Gr. 1000.

Fig. 8. — *Orge* (mêmes conditions). Cellule épidermique de jeune feuille. Réseaux vacuolaires. Gr. 1000.

Fig. 9. — *Orge* (mêmes conditions). Cellule épidermique au sommet de la jeune feuille. Grandes vacuoles, plastes amylifères et microsomes. Gr. 800.

Fig. 10 et 11. — *Orge* (mêmes conditions). Cellules du méristème vasculaire, 10, très près des initiales. 11, un peu plus éloignée des initiales. Gr. 1000.

Fig. 12, 13, 14, 15. — Cellules des assises protéiques colorées vitalement. 12, Orge de 3 jours. 13, Avoine de 3 jours. 14, Blé de 48 heures. 15, Maïs, germination avancée. Gr. 800.

Fig. 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23. — Cellules épidermiques du scutellum. 16, Orge de 24 h. Grains d'aleurone et

quelques masses vacuolaires. Gr. 1000. 17, Orge, plantule âgée, réseau vacuolaire autour du noyau. Gr. 1000. 18, Avoine de 24 h., coupe transversale. Gr. 800. 19, Avoine, graine. Deux cellules vues de face, coloration vitale des noyaux. Gr. 800. 20, Avoine de 48 h. Cellule de face. Gr. 800. 21, Maïs, jeune germination, cellule vue de face. Gr. 1000. 22, Blé de 48 h. Cellule vue de face. Gr. 1000. 23, Blé, plantule âgée. Gr. 700.

Fig. 24. — *Orge*. Cellule de l'assise protéique (germination avancée). Dégénérescence, vacuole unique, cytoplasme très granuleux. Gr. 600.

PLANCHE IX

Pollen des Gymnospermes

(Toutes les figures représentent des colorations vitales au moyen de rouge neutre.)

Fig. 1. — *Taxus baccata*. Pollen le 14 février ; grande vacuole et noyau pariétal ; dans le cytoplasme, plastes à amidon microsomes. Gr. 1000.

Fig. 2. — *Taxus baccata*. Pollen un peu avant maturité ; exine brisée, membrane interne gonflée et colorée ; vacuome formé de sphérules distinctes et noyau central ; des granulations cytoplasmiques. Gr. 1000.

Fig. 3. — *Taxus baccata*. Pollen mûr ; coque non éclatée. Gr. 1000.

Fig. 4. — *Taxus baccata*. Pollen mûr ; membrane interne démesurément gonflée et colorée ; très nombreuses sphérules vacuolaires. Gr. 1000.

Fig. 5. — *Cephalotaxus Fortunei*. Pollen le 4 avril avant maturité ; cellule unique, noyau central, grains d'amidon parfois composés, sphérules vacuolaires, microsomes à la périphérie. Gr. 1000.

Fig. 6. — *Cephalotaxus Fortunei*. Division d'un grain de pollen ; chromosomes distincts, sphérules vacuolaires. Gr. 1000.

Fig. 7. — *Cephalotaxus Fortunei*. Pollen mûr le 1er mai. Cellule végétative ; grains d'amidon et sphérules vacuolaires ; cellule générative : grains d'amidon et réseau vacuolaire alcalin. Gr. 1000.

Fig. 8. — *Cephalotaxus Fortunei*. Cellule générative isolée : réseau vacuolaire alcalin. Gr. 1200.

Fig. 9. — *Biota orientalis.* Pollen mûr. Exine rejetée sur le côté ; membrane interne gonflée et colorée ; dans les deux cellules, autour du noyau, amidon, vacuoles et microsomes à la périphérie. Gr. 1000.

Fig. 10. — *Biota orientalis.* Cellule générative seule représentée : réseau vacuolaire alcalin, amidon, microsomes. Gr. 1400.

Fig. 11. — *Biota orientalis.* Même légende que précédemment. Gr. 1400.

Fig. 12. — *Cupressus Lawsonia.* Pollen mûr bicellulaire à l'intérieur de sa membrane gélifiée. Notation comme pour la fig. 9. Gr. 1000.

Fig. 13. — *Cupressus Lawsonia.* Cellule générative isolée ; sphérules vacuolaires alcalines. Gr. 1400.

Fig. 14. — *Cupressus Lawsonia.* Cellule générative ; vacuome filamenteux. Gr. 1400.

Fig. 15. — *Gingko biloba.* Pollen à la première division de maturation. Gr. 1000.

Fig. 16. — *Gingko biloba.* Deuxième division de maturation. Gr. 1000.

Fig. 17. — *Gingko biloba.* Grain de pollen mûr. Sphérules vacuolaires colorées. Gr. 1000.

PLANCHE X

Bourgeons de Gymnospermes

Fig. 1. — *Cedrus Libani.* Coupe du point de végétation en septembre, traitée par l'acide osmique. Zones tannifères en noir. Gr. 50.

Fig. 2. — *Cedrus Libani.* Sommet du cône végétatif (acide osmique). Gr. 50.

Fig. 3. — *Cedrus Libani.* Jeune feuille dont l'épiderme est déjà totalement tannifère (acide osmique). Gr. 50.

Fig. 4 et 5. — *Cedrus Libani.* Deux très jeunes feuilles au stade où commence l'élaboration du tannin (acide osmique). Gr. 50.

Fig. 6. — *Cedrus Libani.* Deux cellules épidermiques ; réseaux tannifères (acide osmique). Gr. 1000.

Fig. 7. — *Cedrus Libani.* Trois cellules épidermiques provenant de la feuille (4) ; trois états du vacuome tannifère (acide osmique). Gr. 800.

Fig. 8. — *Cedrus Libani*. Deux cellules provenant du sommet du point végétatif ; plastes et microsomes (in vivo). Gr. 1000.

Fig. 9. — *Cedrus Libani*. Cellule épidermique d'une très jeune feuille. Grains de tannin précipités dans un réseau vacuolaire (acide osmique). Gr. 800.

Fig. 10. — *Cedrus Libani*. Portion d'épiderme dans une très jeune feuille du printemps (acide osmique). Gr. 1000.

Fig. 11. — *Cedrus Libani*. Cellule sous épidermique ; jeune feuille du printemps (acide osmique). Gr. 1000.

Fig. 12. — *Larix leptolepis*. Portion du point végétatif. Gr. 40.

Fig. 13. — *Larix leptolepis*. Cellule épidermique tannifère de jeune feuille (acide osmique). Gr. 1500.

Fig. 14. — *Larix leptolepis*. Deux cellules épidermiques au sommet du cône végétatif. Plastes allongés, microsomes. Gr. 1500.

Fig. 15. — *Taxus baccata*. Deux cellules épidermiques ; à gauche, cellule embryonnaire ; à droite cellule tannifère (acide osmique). Gr. 1500.

Fig. 16. — *Taxus baccata*. Trois cellules épidermiques de jeune feuille ; deux cellules embryonnaires, une cellule tannifère à vacuome réfringent (in vivo). Gr. 1500.

Fig. 17. — *Taxus baccata*. Portion du point végétatif. Gr. 60.

Fig. 18. — *Torreya nucifera*. Sommet du point végétatif en septembre (in vivo). Gr. 15.

Fig. 19. — *Taxus baccata*. Jeune feuille (acide osmique). Gr. 60.

Fig. 20. — *Cedrus Libani*. Portion du sommet du point végétatif (Pousse longue). Gr. 60.

PLANCHE XI

Bourgeons de Gymnospermes

Fig. 1. — *Abies Nordmanniana* (bourgeon de septembre). Portion d'épiderme de jeune feuille ; trois cellules embryonnaires et trois cellules tannifères, à droite ; plastes et microsomes (in vivo). Gr. 1200.

Fig. 2. — *Abies Nordmanniana*. Jeune feuille non colorée (in vivo) Gr. 60.

Fig. 3. — *Abies Nordmanniana*. Jeune feuille après action de l'acide osmique. Gr. 60.

Fig. 4. — *Abies Nordmanniana*. Portion de cône végétatif en septembre. Gr. 30.

Fig. 5. — *Abies Nordmanniana.* Portion du cône végétatif, coupé et traité par l'acide osmique. Gr. 30.
Fig. 6. — *Abies Nordmanniana.* Cellule épidermique de jeune feuille ; vacuome tannifère en noir (acide osmique). Gr. 1200.
Fig. 7. — *Abies Nordmanniana.* Cellule épidermique de jeune feuille vivante ; vacuome filamenteux réfringent. Gr. 1200.
Fig. 8. — *Picea excelsa* (bourgeon de septembre). Portion d'épiderme ; cellules embryonnaires, plastes allongés et microsomes. Gr. 1000.
Fig. 9. — *Picea excelsa.* Trois jeunes feuilles (in vivo). Gr. 60.
Fig. 10. — *Picea excelsa.* Cellule épidermique ; réseau vacuolaire tannifère (acide osmique). Gr. 1000.
Fig. 11. — *Picea excelsa.* Cône végétatif (septembre). Gr. 30.
Fig. 12. — *Picea excelsa.* Quatre cellules épidermiques de jeune feuille (avril) ; deux cellules embryonnaires et deux cellules tannifères à vacuome réfringent (in vivo). Gr. 1200.
Fig. 13. — *Picea excelsa.* Cellule épidermique de jeune feuille ; réseau tannifère (acide osmique). Gr. 1000.

PLANCHE XII

Fixation Regaud, coloration a l'hématoxyline ferrique

Fig. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. — Cellules de plantules du *Pinus maritima.*
Fig.1. — Graine mûre ; cellule épidermique du cotylédon. Cytoplasme à disposition alvéolaire ; espaces clairs occupés « in vivo » par de l'huile. Granulations sur les trabécules cytoplasmiques (plastes « pro parte »). Aleurone dont la protéine est précipitée de façon variable. Gr. 1200.
Fig. 2. — Graine mûre ; groupe de quatre cellules dans le massif initial de la radicule. Tous les éléments colorables du cytoplasme sont granuleux : les plus gros représentent des grains d'aleurone. Gr. 1000.
Fig. 3. — Graine mûre ; cellule du massif initial de la gemmule. Grains d'aleurone, plastes et réseau cytoplasmique. Gr. 1000.
Fig. 4. — Graine mûre ; cellule de parenchyme.

Grains d'aleurone de tailles diverses : les plus gros sont à inclusions, les plus petits dépourvus d'inclusions sont colorés en totalité. Cytoplasme alvéolaire avec cavités anciennement occupées par de l'huile. Gr. 1000.

Fig. 5. — Graine germée, dont la coque n'est pas ouverte. Cellule parenchymateuse de l'hypocotyle ; plastidome granuleux ; aleurone ; les espaces clairs dans le cytoplasme correspondent soit à des vacuoles aleuriques, soit à des lacunes huileuses. Gr. 1000.

Fig. 6. — Graine germée, mêmes conditions. Epiderme des cotylédons. Petits grains d'aleurone encore intacts. Granulations sur le réseau cytoplasmique. Gr. 1000.

Fig. 7. — Graine germée, mêmes conditions. Cellule du parenchyme des cotylédons. Aleurone, plastes porteurs d'amidon et microsomes. Gr. 1000.

Fig. 8. — Graine germée, mêmes conditions. Parenchyme des cotylédons. Aleurone. Plastes, microsomes, espaces d'huile. Gr. 1000.

Fig. 9. — Graine germée, plantule dont la racine a 1^{cm} de long. Parenchyme, base des cotylédons. Mitoplastes porteurs d'amidon ; microsomes non différenciés. Gr. 1000.

Fig. 10. — Graine germée, coque de la graine non ouverte. Portion d'un tube sécréteur correspondant à l'emplacement de son noyau. Cellules de parenchyme qui le bordent. (Extrémité de la radicule.)

Dans le tube sécréteur, des *mitoplastes* porteurs d'une vésicule claire se trouvent, ainsi que des microsomes, dans une mince couche de cytoplasme pariétal ; vacuoles à fin précipité granuleux peu coloré ; noyau très gros, à nucléoles alignés ; autour du noyau, le cytoplasme abondant occupe tout l'espace libre. Gr. 800.

Fig. 11 et 12. — *Cedrus Libani.* (11) Cellule épidermique d'une très jeune feuille en septembre. Réseau vacuolaire tannifère coloré dans ses plus petits détails. Plastes allongés dans le cytoplasme. (12) Cellule de parenchyme montrant un réseau vacuolaire coloré. Gr. 1200.

Fig. 13 et 14. — *Abies Nordmanniana.* (13) Cellule épidermique d'une très jeune feuille en septembre. Réseau vacuo-

laire coloré et plastes. (14) Cellule de parenchyme, boules vacuolaires colorées et plastes. Gr. 1200.

Fig. 15, 16, 17. — *Larix leptolepis.* (15) Cellule épidermique d'une très jeune feuille en octobre. Canalicules vacuolaires incolores, plastes allongés. (16) Cellule de parenchyme jeune ; nombreuses sphérules colorées précipitées dans le vacuome ; plastes allongés et flexueux. (17) Cellule de parenchyme adulte : vacuome dilaté renfermant des corpuscules de nature phénolique, plastes globuleux. Gr. 1500.

Fig. 18. — *Pin maritime* (Plantule dont la racine a 1^{cm} de long). Cellule de l'écorce hypocotylaire. Reste de matière aleurique dans les grandes vacuoles. Gros plastes porteurs de grains d'amidon volumineux. Microsomes. Gr. 1000.

PLANCHE XIII

CELLULES FIXÉES ET COLORÉES PAR LA MÉTHODE DE REGAUD.

Fig. 1. — *Ricinus communis.* Cellule d'albumen un peu avant maturité. Grains d'aleurone dont la protéine se précipite de façon diverse autour des inclusions. Noyau étoilé ; cytoplasme alvéolaire avec plastes. Gr. 800.

Fig. 2. — *Ricinus communis.* Cellule d'albumen un peu avant maturité (assise sous jacente aux cellules périphériques). Grains d'aleurone homogènes ou contenant une seule inclusion (cristalloïde). Les plastes sont décolorés. Gr. 800.

Fig. 3. — *Ricinus communis.* Portion du cytoplasme dans un albumen avant maturité (cellule profonde). Grains d'aleurone de deux tailles très différentes ; les gros ont leur protéine précipitée et très colorée, les petits peuvent être homogènes. Gr. 1200.

Fig. 4. — *Ricinus communis.* Cellule profonde d'albumen après germination (long. rac. plant. = 1/2 cm.) ; aleurone transformée en vacuoles contenant des corpuscules précipités. Gr. 800.

Fig. 5. — *Ricinus communis.* Cellule de la périphérie de l'albumen en coupe transversale (graine mûre). Grains d'aleurone homogènes. Gr. 1000.

Fig. 6 et 7. — *Ricinus communis.* Deux grains d'aleurone isolés

(graine mûre, cellule profonde) ; dans l'un, grains de protéine précipités et très colorés. Gr. 1200.

Fig. 8. — *Ricinus communis*. Cellule profonde d'albumen (long. rac. plant. = 1/2 cm.). Une seule vacuole contenant des précipitations colorées autour du restant des inclusions et sur la paroi vacuolaire ; plastes. Gr. 800.

Fig. 9, 10, 11, 12. — *Ricinus communis*. Quatre vacuoles aleuriques provenant d'un albumen germé ; digestion des inclusions et précipitations diverses. Gr. 1000.

Fig. 13. — *Ricinus communis*. Cellule d'albumen mûr (cellule profonde). Grains d'aleurone de deux tailles différentes ; plastes et microsomes. Gr. 800.

Fig. 14. — *Pinus maritima*. Cellule de la radicule, près des initiales. Noyau à la prophase ; mitoplastes, vacuoles contenant des corpuscules colorés. Gr. 1200.

Fig. 15. — *Pinus maritima*. Cellule allongée du faisceau procambial de la radicule ; plastes divers dont certains élaborent de l'amidon ; vacuoles irrégulières résultant de la modification d'un réseau sous l'action du fixateur. Gr. 1200.

Fig. 16. — *Gingko biloba*. Grain de pollen avant les divisions de maturation (Regaud). Petites vacuoles claires, plastes noirs, microsomes non différenciés. Gr. 1000.

Fig. 17. — *Cephalotaxus Fortunei*. Grain de pollen après les divisions réductrices. Réseau vacuolaire clair, plastes et microsomes. Gr. 1000.

Fig. 18. — *Taxus baccata*. Grain de pollen une quinzaine de jours avant maturation ; grandes vacuoles claires ; plastes noirs, microsomes non différenciés. Gr. 1000.

Fig. 19. — *Cephalotaxus Fortunei*. Coupe au travers de grains de pollen, encore réunis en tétrades. Gr. 1000.

PLANCHE XIV

Cellules fixées et colorées par les méthodes de Regaud et de Laguesse

Fig. 1. — Portion d'un tube sécréteur chez une très jeune plantule de *Cedrus Libani* (coque non ouverte). La région figurée est celle qui renferme le noyau. Dans le cytoplasme : *plastes allongés*, parfois porteurs d'une vésicule incolore et *microsomes* granuleux et très nom-

breux. *Vacuome* comprenant de grandes vacuoles à sécrétion dont le contenu est précipité et de petites sphérules ayant noirci par l'effet de l'acide osmique (méthode J. de Laguesse). Gr. 1000.

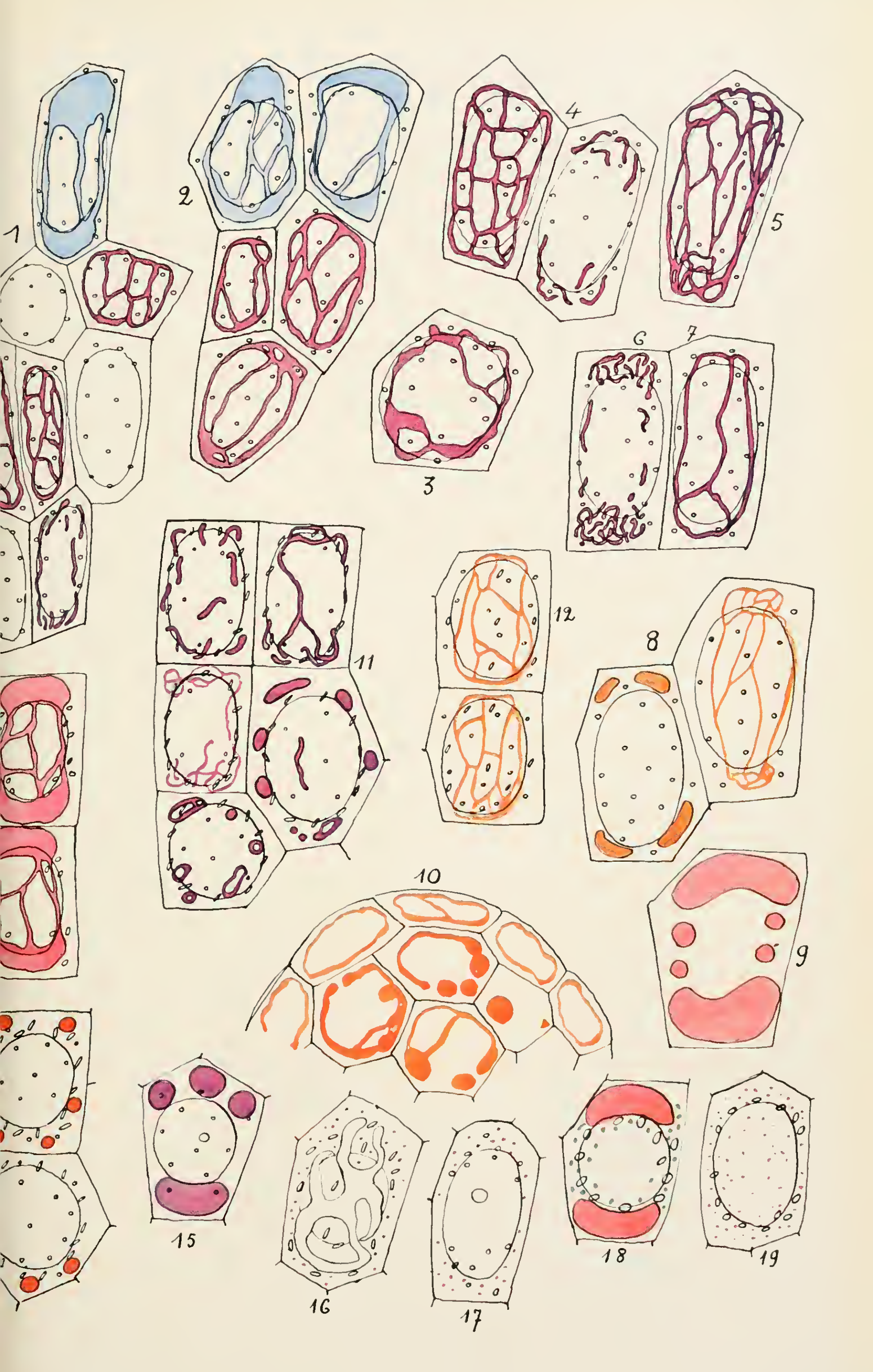
Fig. 2. — Portion d'un tube sécréteur chez un embryon de la graine de *Cedrus Libani*. La région figurée renferme le noyau. Dans le cytoplasme, éléments allongés ou en courts bâtonnets, rarement granuleux (*plastes*). Les *microsomes* manquent. Vacuome formé de boules de grosseurs variables, homogènes, jaune d'or, non colorées par l'hématoxyline (méthode de Regaud). Gr. 1000.

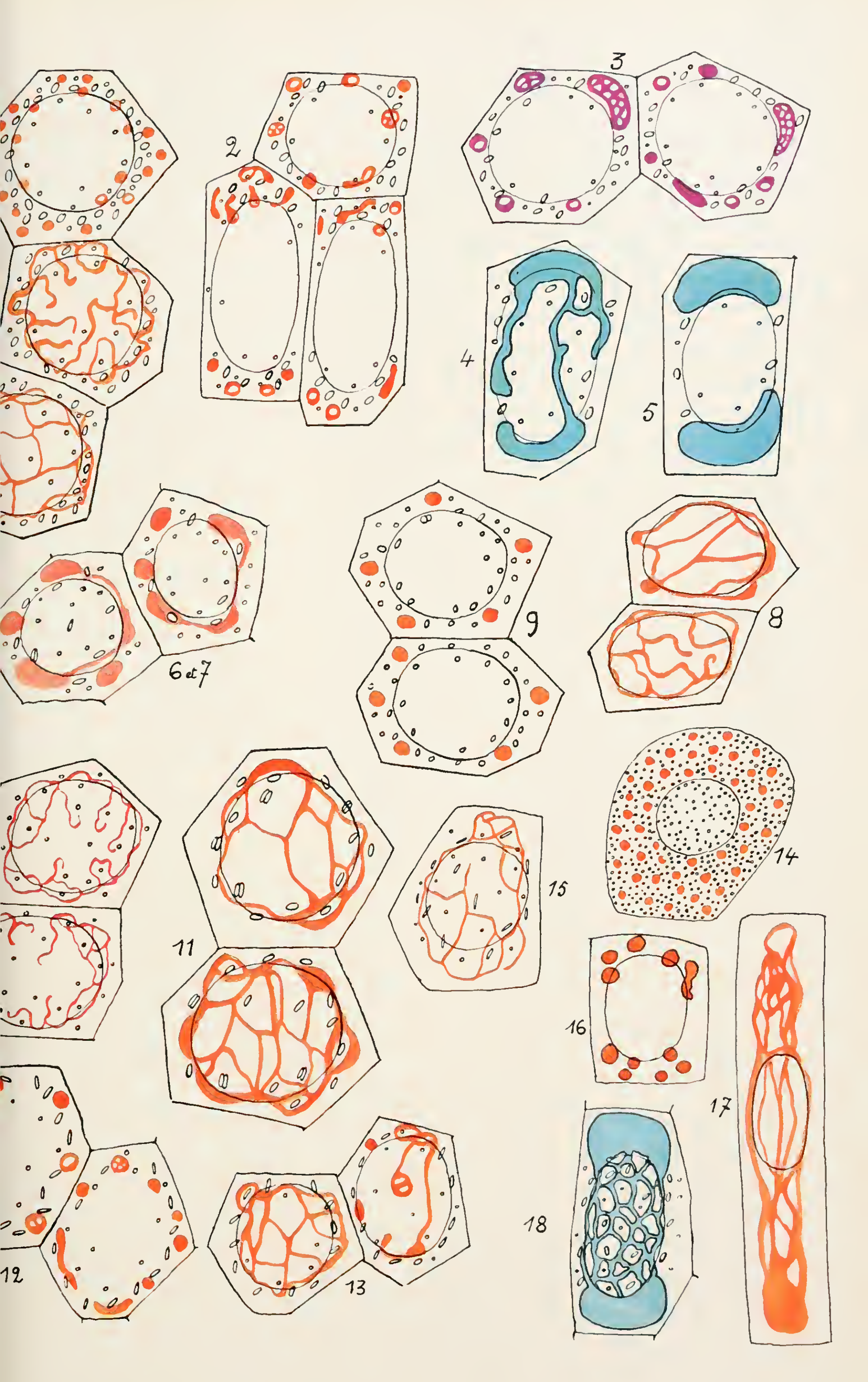
Fig. 3. — Cellule sous épidermique de l'hypocotyle dans un embryon de graine chez le *Pinus maritima*. Cytoplasme alvéolaire (les alvéoles contenaient de l'huile « in vivo »). Granulations sur la trame (plastes) ; grains d'aleurone (méthode de Regaud). Gr. 1500.

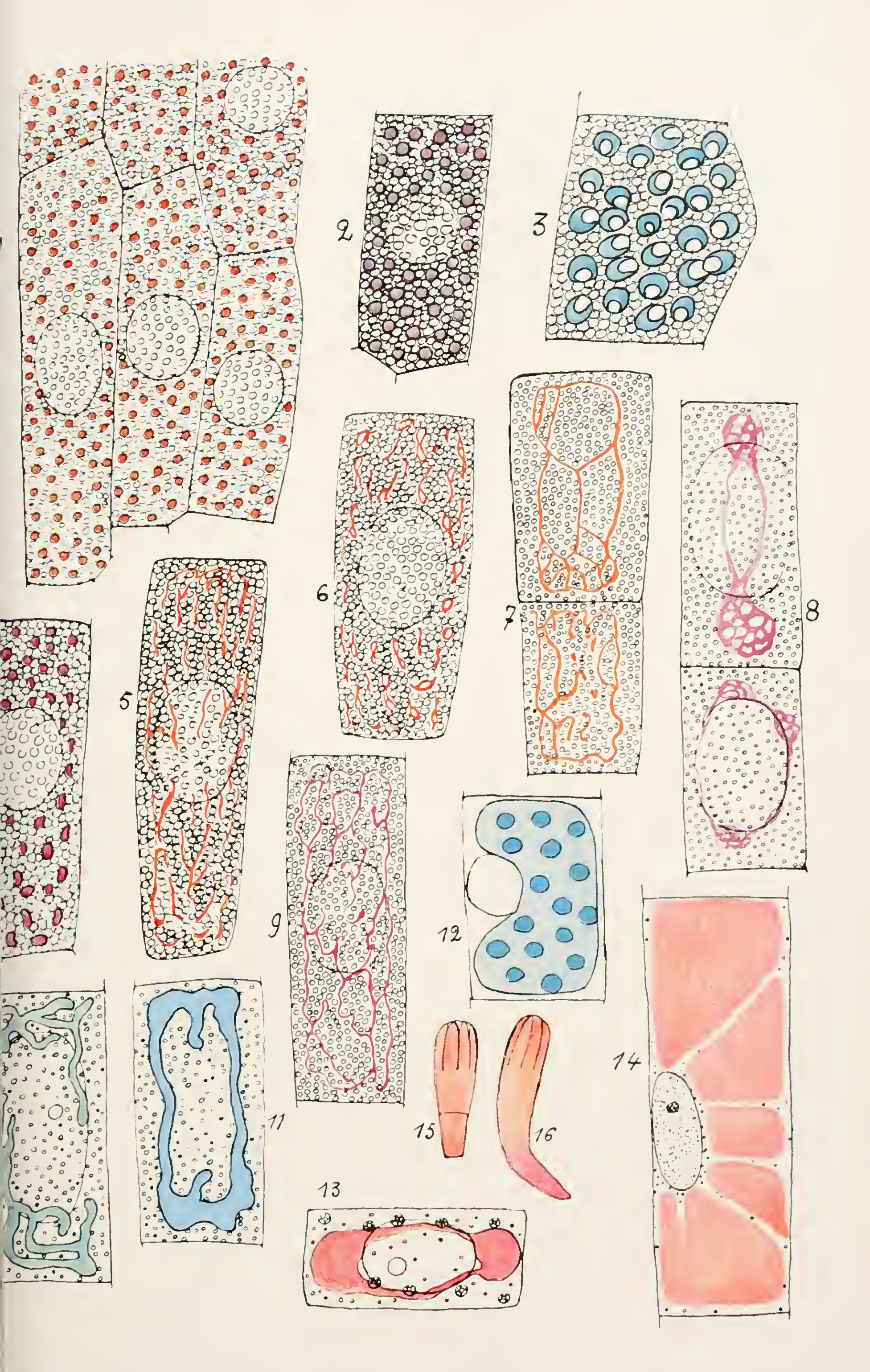
Fig. 4. — Grains d'aleurone de la cellule précédente vus à un grossissement supérieur. Il y a parfois un dépôt coloré sur la paroi vacuolaire (précipitation partielle de la protéine et non pas écorce mitochondriale). Gr. 3000.

Fig. 5. — Grain de pollen de *Taxus baccata* un peu avant la maturité. Vacuome en réseau clair. Plastes globuleux (méthode J. de Laguesse). Gr. 2000.

Fig. 6. — Même exemple, presque mûr. Cytoplasme alvéolaire (méthode J. de Laguesse). Gr. 2000.


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
15
16
17
18
19


2
3
4
5
6 et 7
8
9
11
12
13
14
15
16
17
18

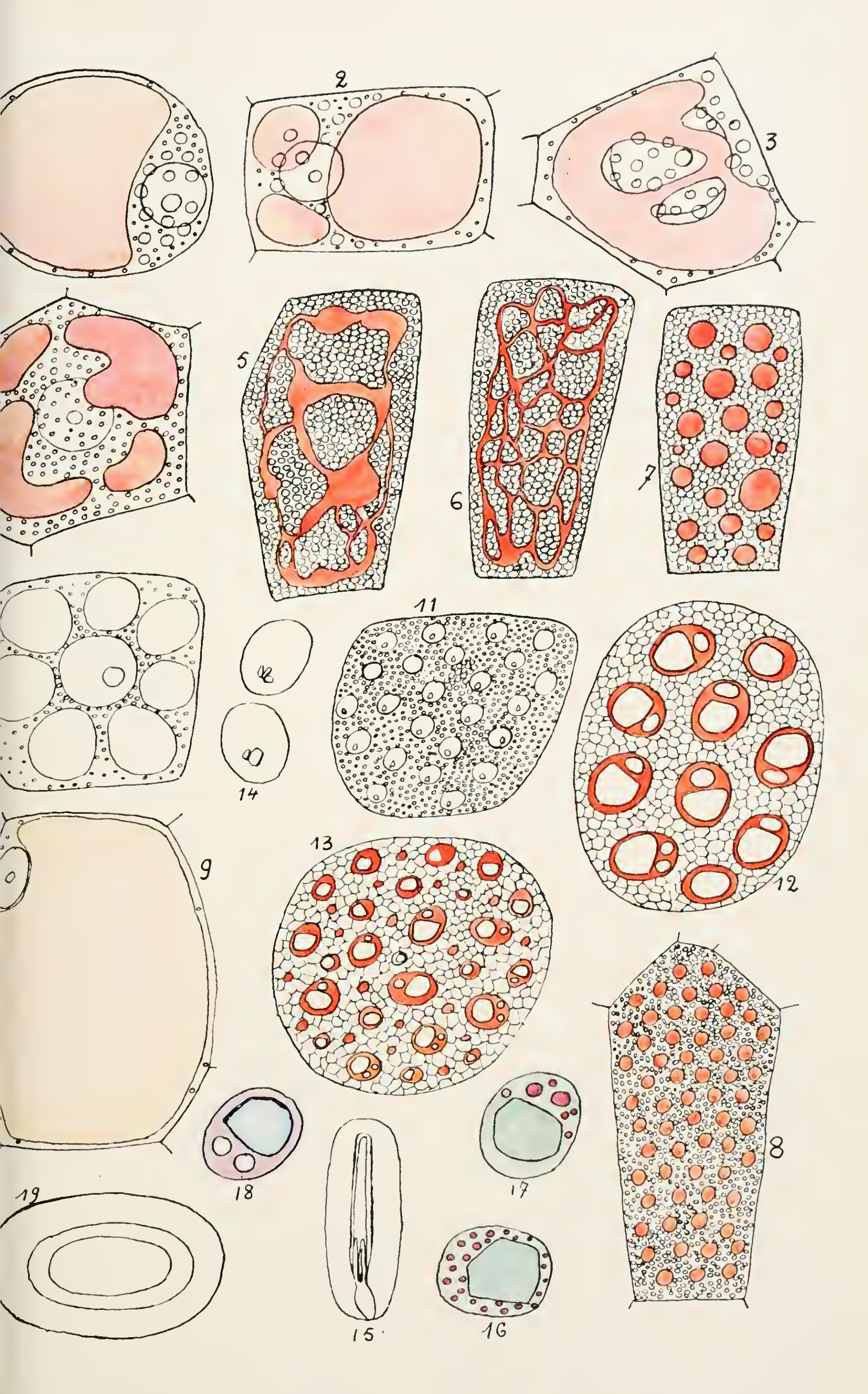


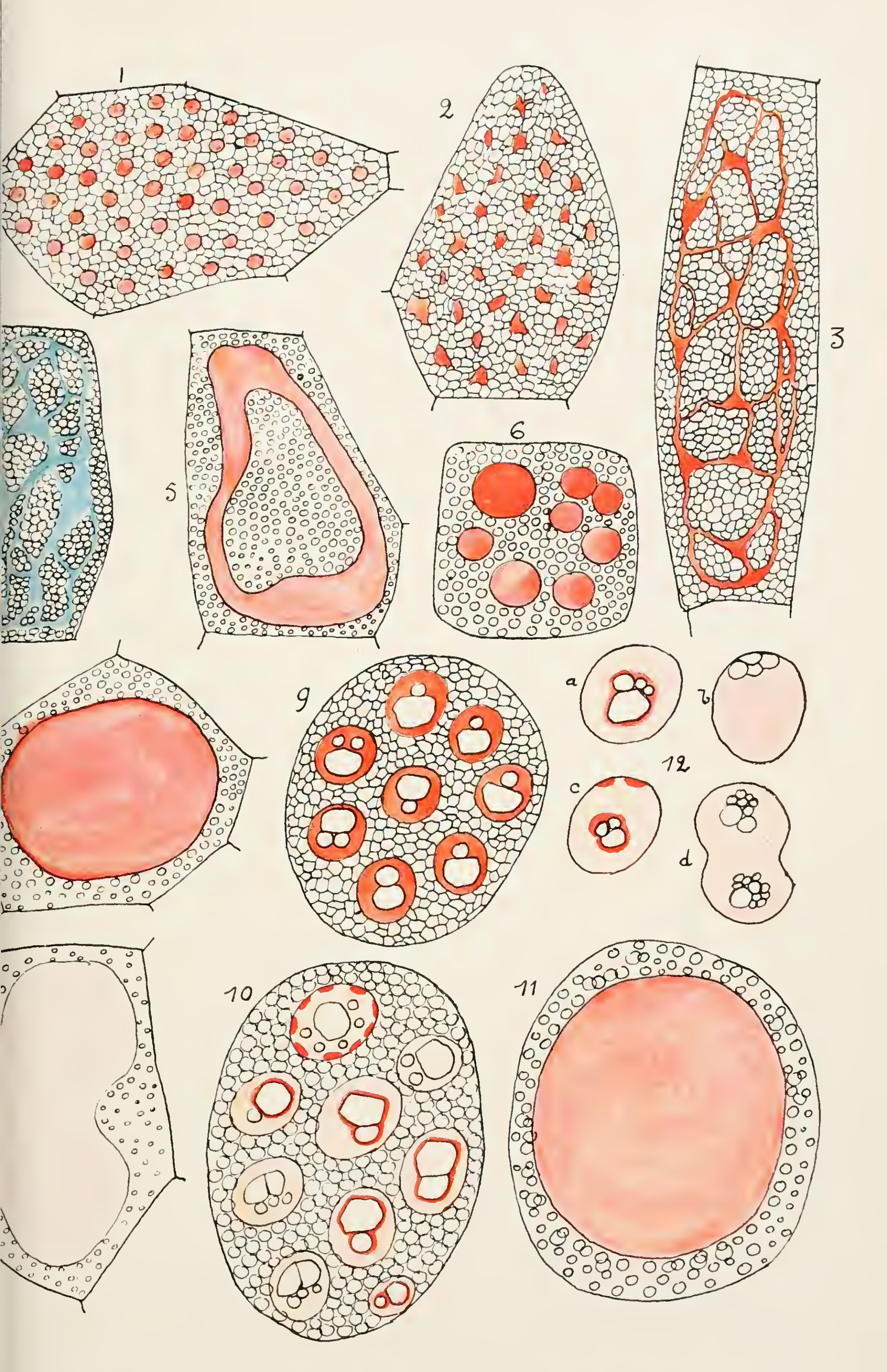
Dangeard. pinx.

G. Deberque. Imp.. Paris.

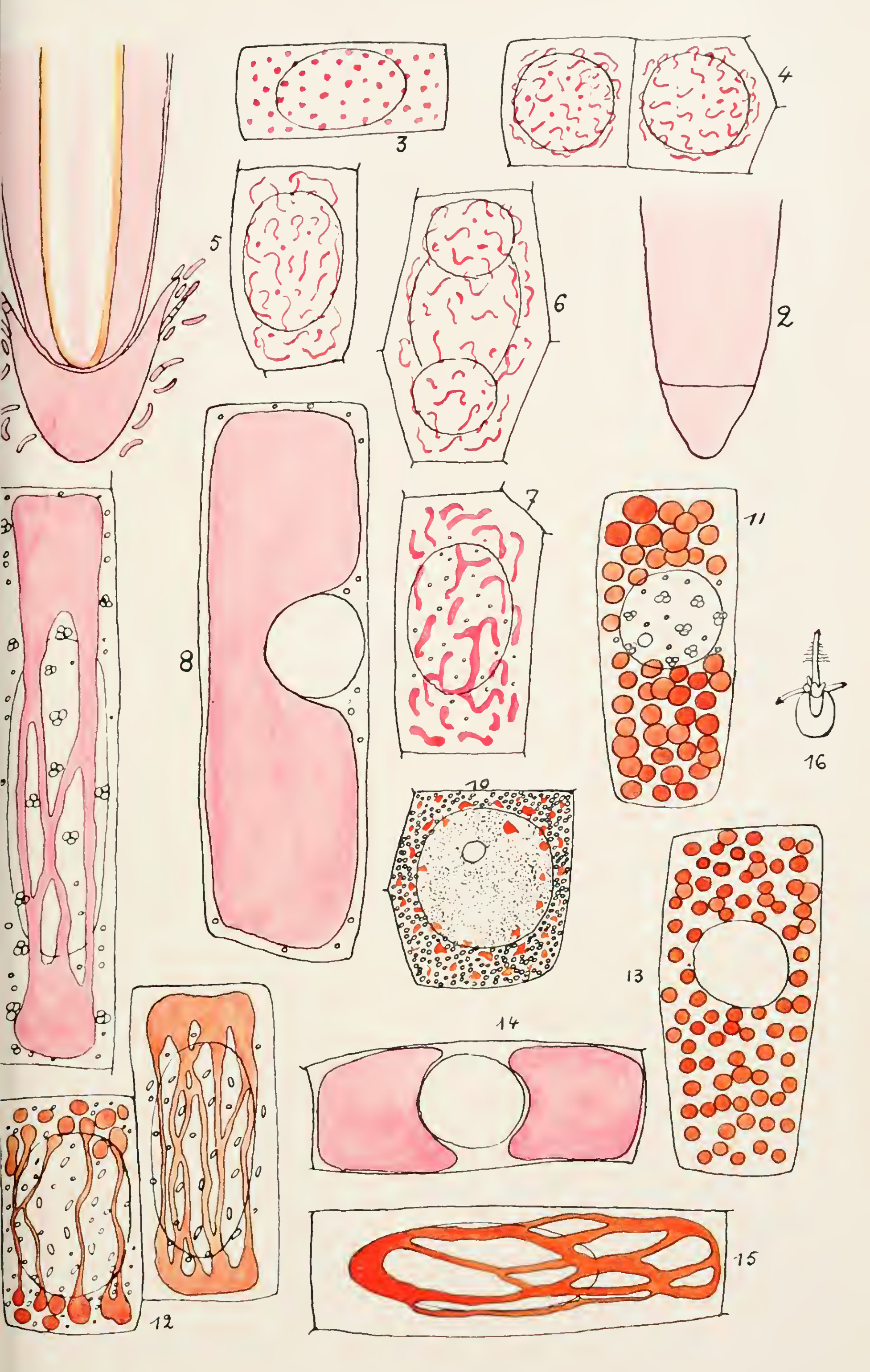
2 3 4 23 18 6 7 8 19 20 10 12 13 9 21 22 14 16 15 17

Dangeard. pinx. G. Deberque. Imp.. Paris.

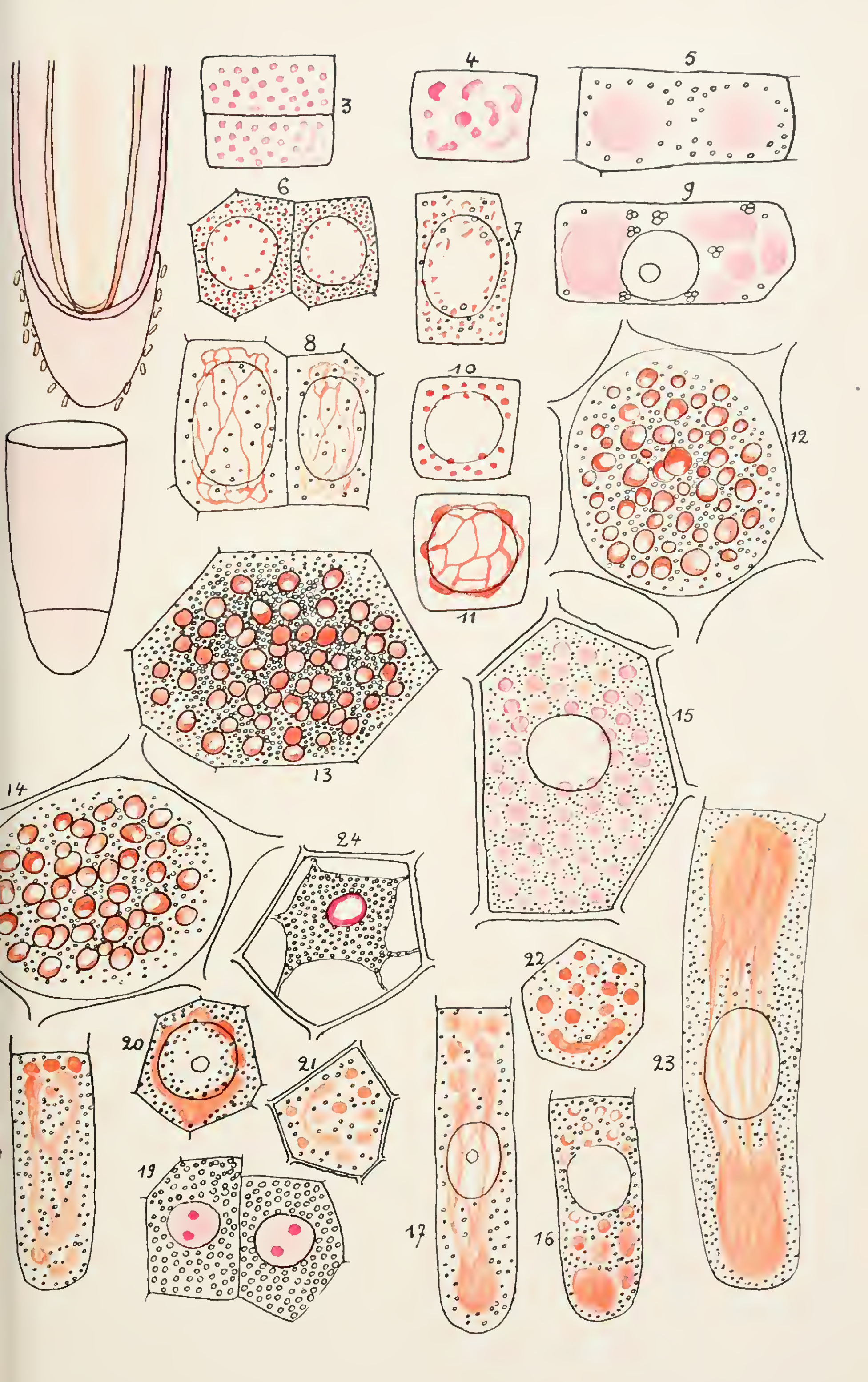

2
3
5
6
7
11
14
13
9
12
18
17
8
19
15
16



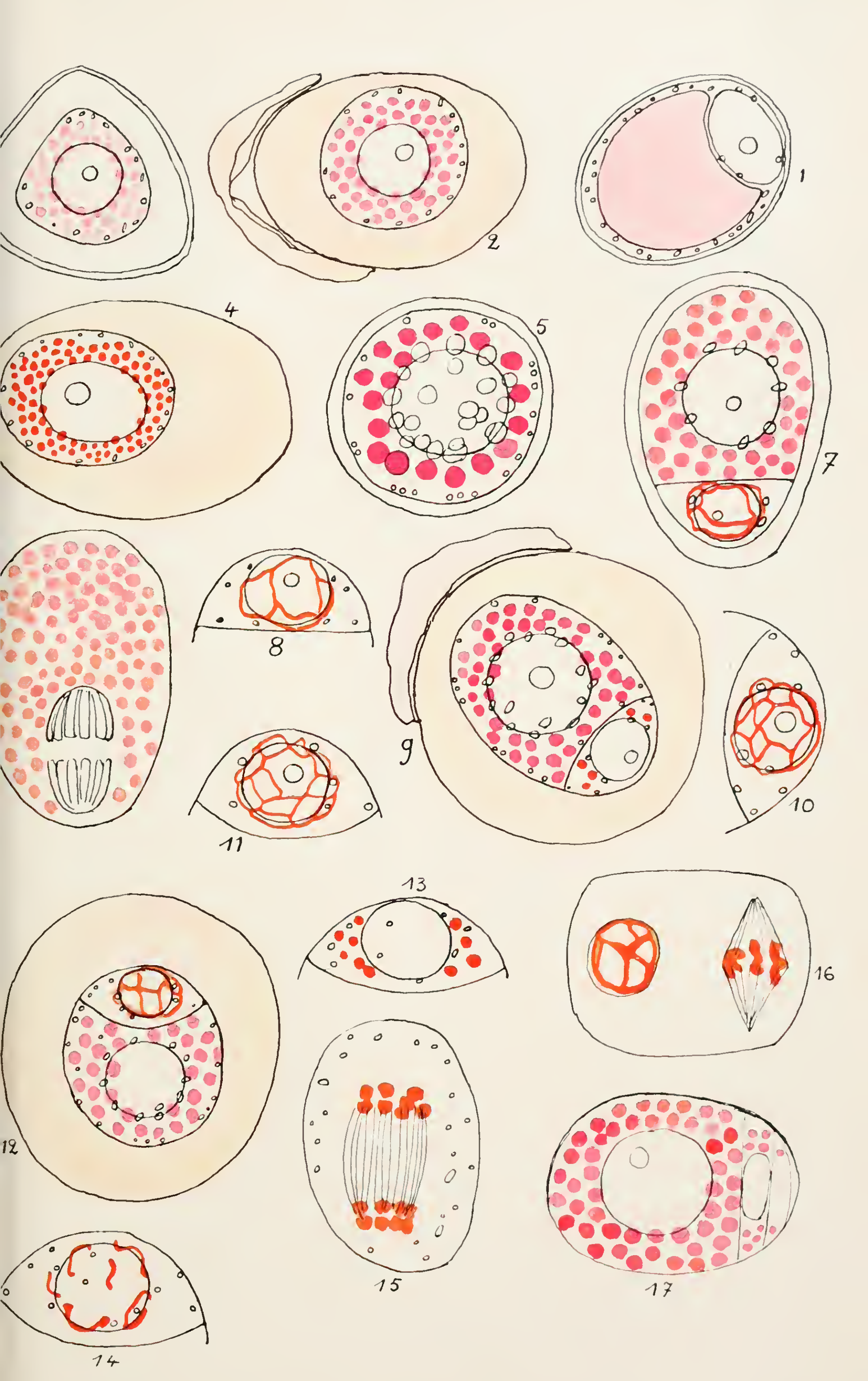
e Dangeard, pinx. G. Deberque, Imp., Paris.

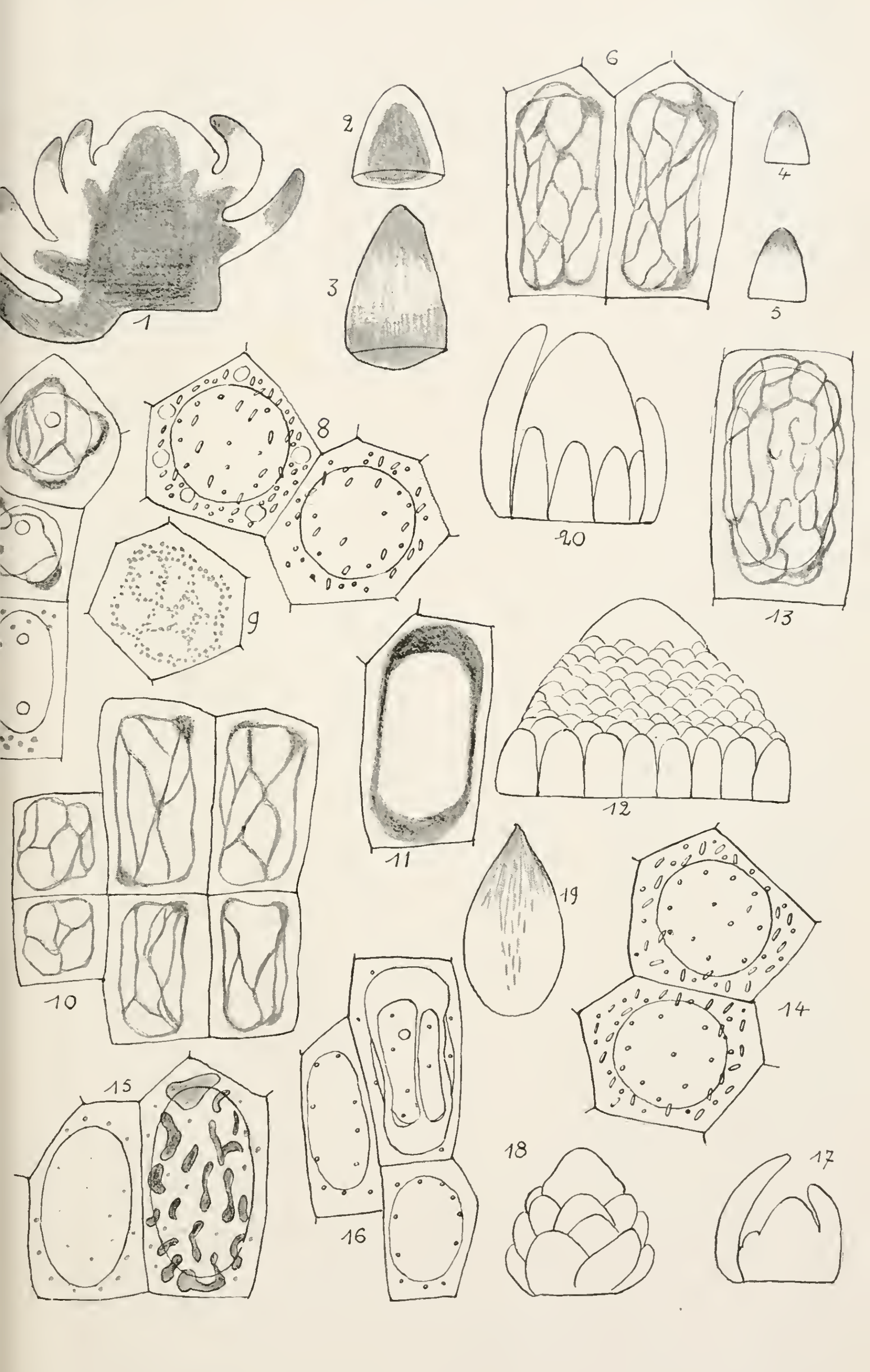


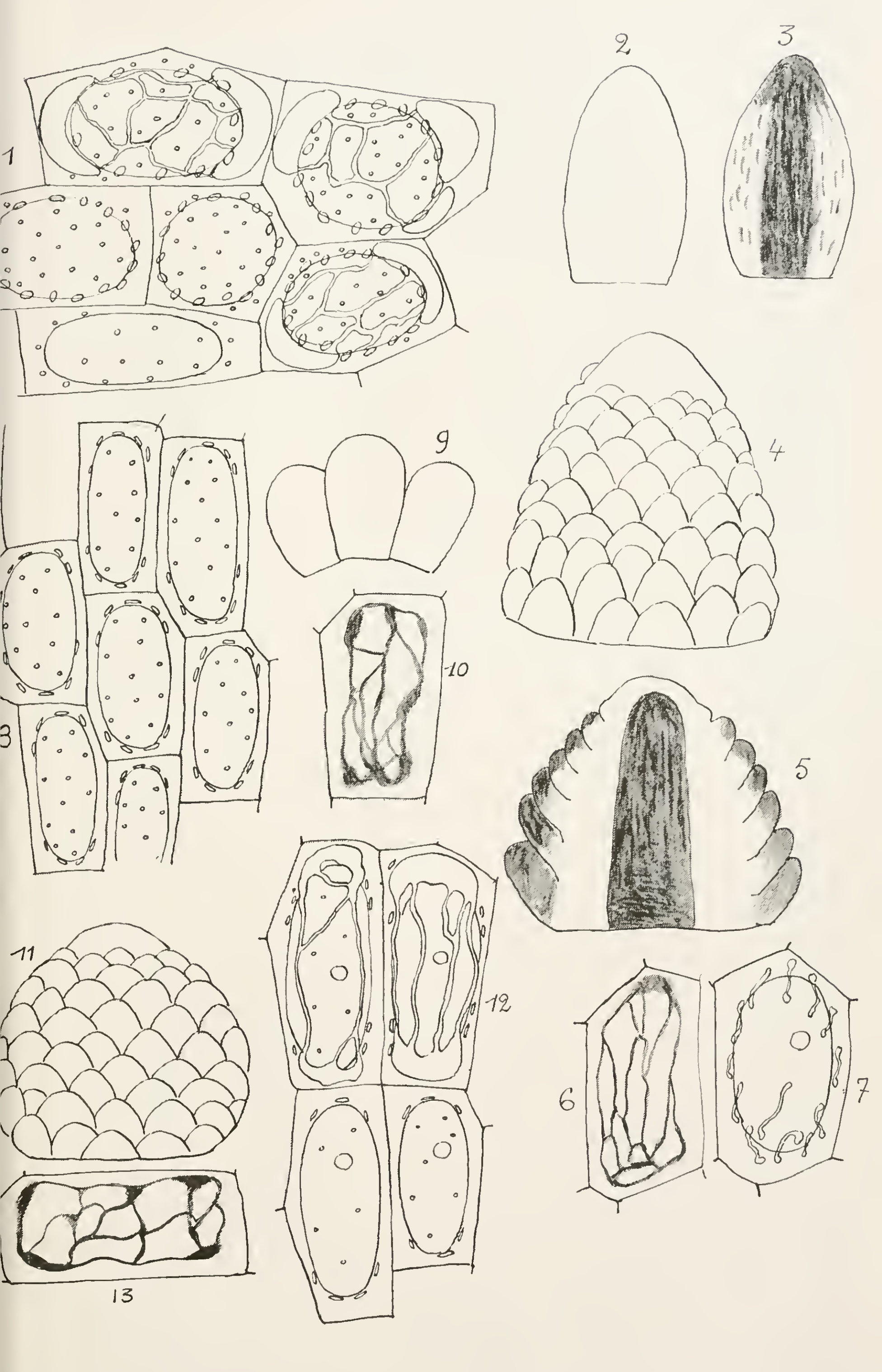
re Dangeard. pinx. G. Deberque. Imp., Paris.



e Dangeard, pinx. G. Deberque, Imp., Paris.

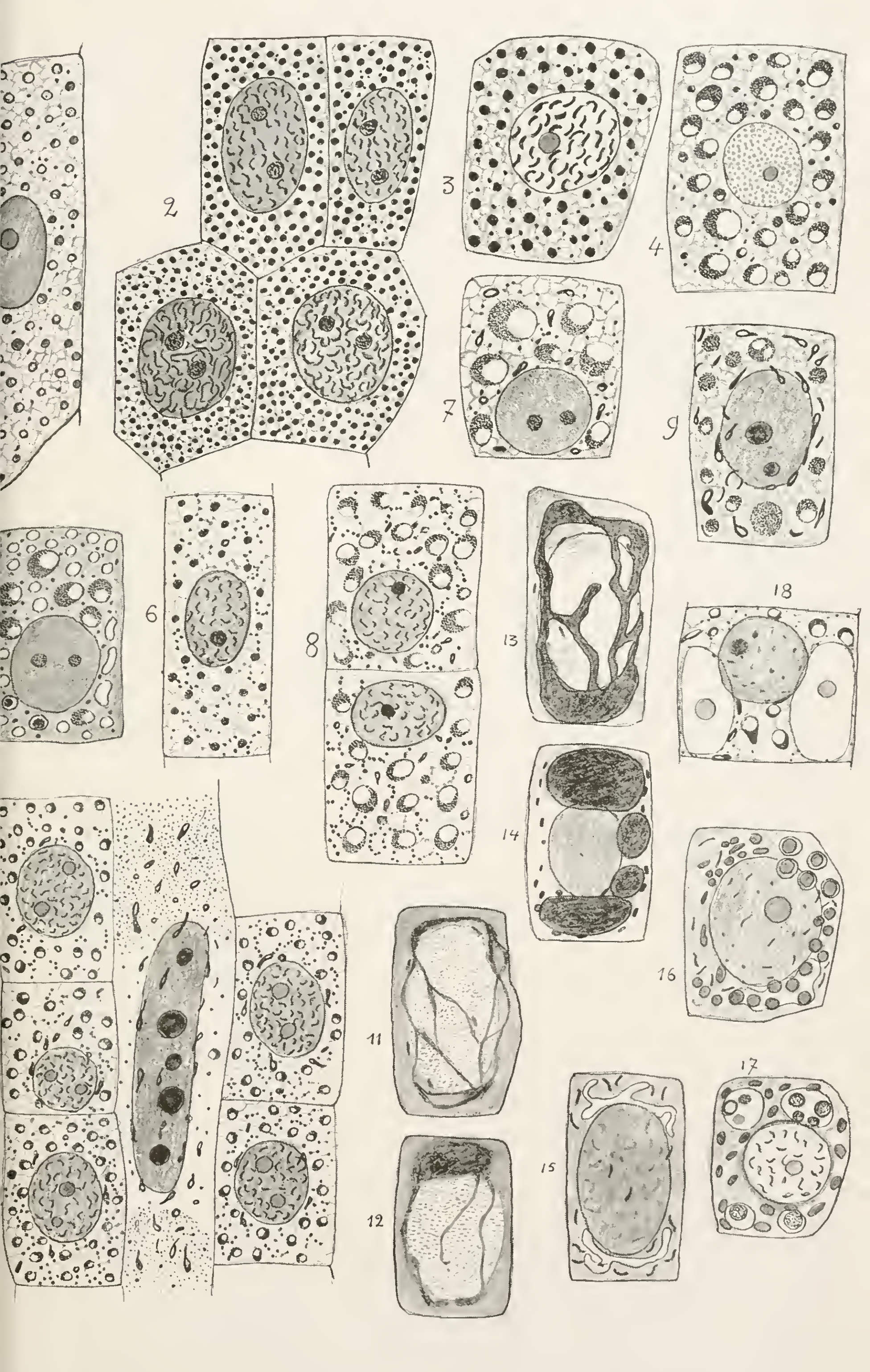

1
2
4
5
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17


1
2
3
4
5
6
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

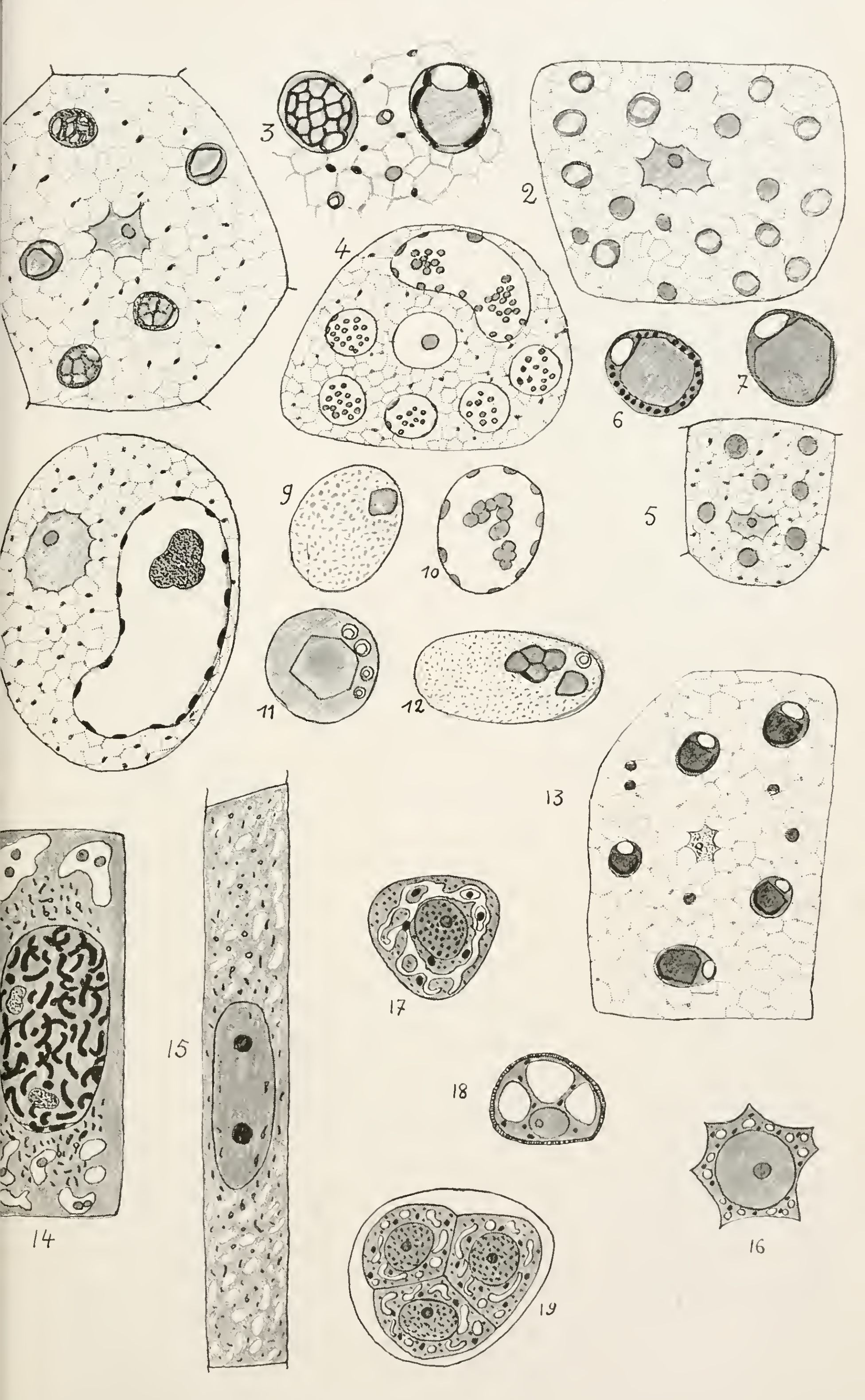


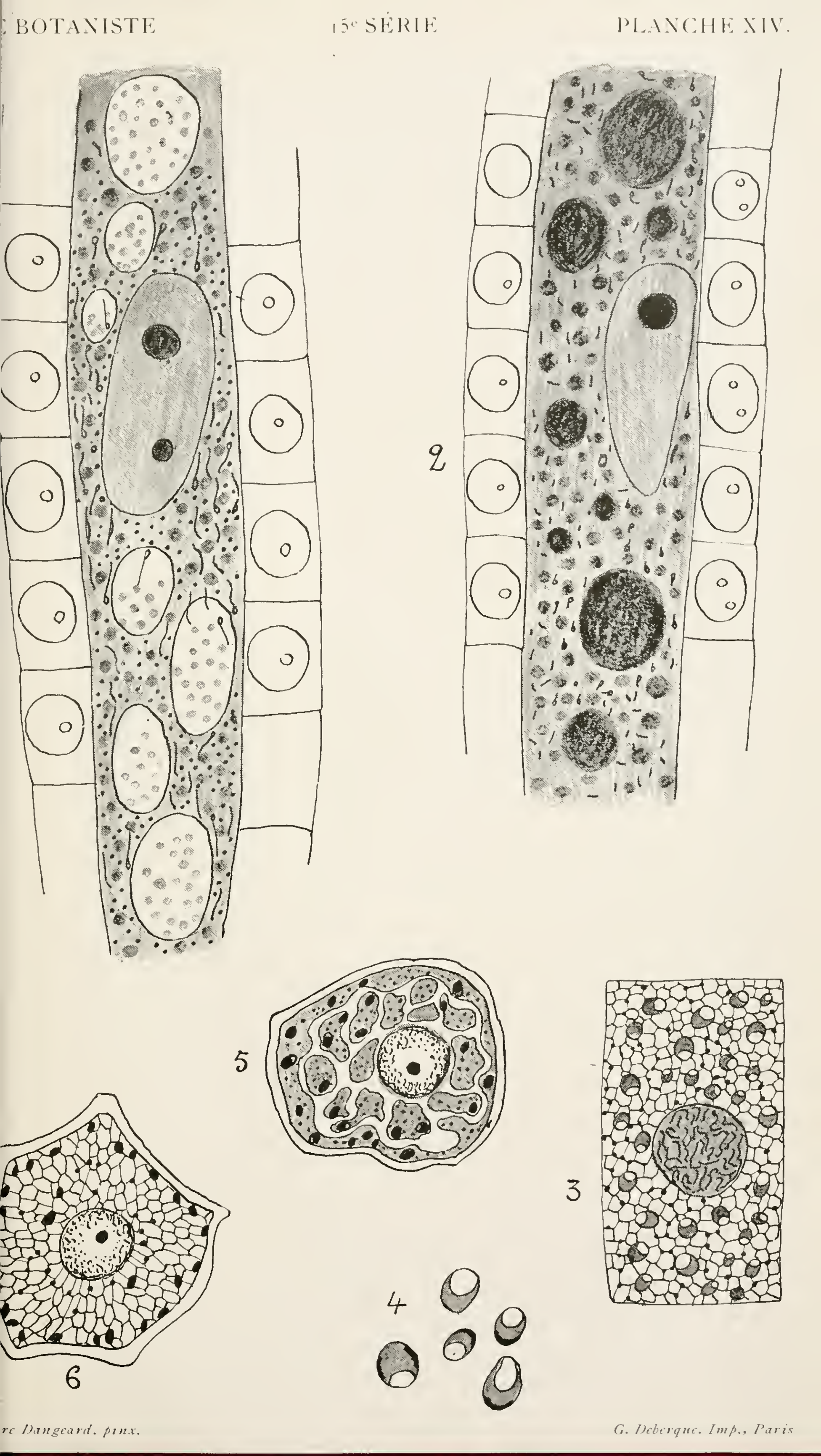
erre Dangeard, pinx.

G. Deberque. Imp., Paris.



re Dangeard, pinx. G. Deberque, Imp., Paris.


3
2
4
6
7
9
10
5
11
12
13
17
15
18
14
16
19



[Pier]re Dangeard, pinx. G. Deberque. Imp., Paris



